

**Evaluierung des  
Sirtuinisoenzym-Expressionsmusters  
in kindlicher akuter  
lymphoblastischer Leukämie**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades**

**doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Rebekka M. Jaeckle, geb. Herrmann  
geboren am 8. April 1991 in Freiberg**

## **Gutachter**

1. Prof. Dr. med. James F. Beck  
Direktor der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Aria Baniahmad  
Institut für Humangenetik, Molekulargenetik, Jena
3. Prof. Dr. med. Olaf Witt  
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Heidelberg

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 02. März 2015**

**Letzter Prüfungstag des Examens: 01. Dezember 2016**

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\psi_m$	mitochondriales Membranpotential
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-aktiviertes X Protein-Gen
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> , Proto-Onkogen, antiapoptotisches Protein
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CPS1	Carbamoylphosphat-Synthetase-1
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert)
DiOC <sub>6</sub> (3)	3'3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid
DMSO	Dimethylsulfon, Zellkulturmedium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphates</i> (Desoxyribonukleosidtriphosphate)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	<i>eventfree survival</i> (ereignisfreies Überleben)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FKS	fetales Kälberserum
FOXO	<i>Forkhead box class O</i>
FSC	<i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
h	<i>hour</i> (Stunde)
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IKZ	Inkubationszeit

KK	Korrelationskoeffizient
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
MMP	mitochondriales Membranpotential
MNC	<i>mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen)
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadeninnukleotid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NTC	<i>not template control</i> (negativ-Kontrollen ohne cDNA)
p53	Protein 53
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI-1640	Zellkulturmedium, formuliert am <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	<i>real-time-polymerase chain reaction</i> (Echtzeit-PCR)
s.	siehe
SDH	Succinatdehydrogenase
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Abweichung von dem Mittelwert)
SIRT	Sirtuin
SSC	<i>side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>- 3 -</b>
2.1. AKUTE LYMPHOBLASTISCHE LEUKÄMIEN (ALL) .....	- 3 -
2.1.1. Epidemiologie kindlicher Leukämien .....	- 3 -
2.1.2. Definition und Ätiologie .....	- 3 -
2.1.3. Symptomatik und Diagnostik .....	- 4 -
2.1.4. Therapie der ALL und Prognose.....	- 5 -
2.2. FUNKTION UND INHIBITION VON HISTONDEACETYLASEN .....	- 7 -
2.2.1. Epigenetik in der Kanzerogenese.....	- 7 -
2.2.2. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) .....	- 8 -
2.2.3. Tumorspezifische HDAC .....	- 9 -
2.3. SIRTUINE.....	- 10 -
2.3.1. Definition der Sirtuine .....	- 10 -
2.3.2. Funktion und Lokalisation .....	- 11 -
2.3.3. Sirtuine und Tumorgenese .....	- 12 -
2.3.4. Sirtuinisoformen und deren Effekte in Tumoren .....	- 14 -
2.4. SIRTUININHIBITOREN .....	- 19 -
2.4.1. GW5074 .....	- 19 -
2.4.2. Cambinol .....	- 20 -
2.5. ZYTOSTATIKA .....	- 21 -
2.5.1. Etoposid .....	- 21 -
2.5.2. Vincristin .....	- 21 -
2.6. ZIELSTELLUNG DER ARBEIT.....	- 22 -
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>- 24 -</b>
3.1. MATERIAL .....	- 24 -
3.1.1. Allgemein verwendetes Material und Geräte.....	- 24 -
3.1.2. Reagenzien und Kits.....	- 25 -
3.1.3. Zelllinien .....	- 26 -
3.1.4. Medium und Puffer .....	- 27 -
3.2. METHODEN .....	- 28 -
3.2.1. Genexpressionsanalyse mit quantitativer Real-Time-PCR..	- 28 -

3.2.1.1. Auftauen kryokonservierter Proben und RNA-Isolation.....	- 28 -
3.2.1.2. Photometrische RNA-Bestimmung .....	- 29 -
3.2.1.3. cDNA-Transkription mit Omniscript® .....	- 29 -
3.2.1.4. TaqMan®-Real-Time-PCR.....	- 30 -
3.2.1.5. Auswertung der TaqMan® -RT-PCR .....	- 32 -
3.2.2. Zellkultivierung.....	- 33 -
3.2.2.1. Auftauen und Kultivieren der kryokonservierten Zellen .....	- 33 -
3.2.2.2. Passagieren der Zellen .....	- 34 -
3.2.2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität .....	- 34 -
3.2.2.4. Fortführen der Zellkultur.....	- 35 -
3.2.2.5. Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche.....	- 35 -
3.2.2.6. Einfrieren und Lagern der Zellen .....	- 36 -
3.2.3. Wirkstoffapplikation.....	- 36 -
3.2.4. Funktionelle Tests .....	- 38 -
3.2.4.1. Caspase-3-Aktivitätstest .....	- 38 -
3.2.4.1.1. Hintergrund des Caspase-3-Aktivitätstest.....	- 38 -
3.2.4.1.2. Durchführung des Caspase-3-Aktivitätstest.....	- 38 -
3.2.4.2. Durchflusszytometrische Analysen .....	- 39 -
3.2.4.2.1. Messung des mitochondrialen Membranpotentials .....	- 41 -
3.2.4.2.2. Zelltodanalyse.....	- 42 -
3.2.4.2.3. Kompensationsmessung.....	- 42 -
3.2.4.2.4. Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen ..	- 43 -
3.2.5. Statistische Analyse der RT-PCR Expressionsdaten.....	- 43 -
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>- 45 -</b>
4.1. SIRTUINEXPRESSIONSANALYSE IN ALL-PATIENTENPROBEN-	45 -
4.1.1. Patientenproben .....	- 45 -
4.1.2. Sirtuinisoenzym-Expression in ALL-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern.....	- 46 -
4.1.3. Korrelation der Sirtuinexpression mit klinisch- pathologischen Parametern.....	- 46 -
4.1.4. Korrelationen der Expression von Sirtuinen und p53.....	- 47 -
4.1.5. Überlebenszeitanalysen.....	- 48 -

4.2.	ZELLKULTUREXPERIMENTE AN CCRF-CEM-ZELLEN.....	- 50 -
4.2.1.	Vorversuche .....	- 51 -
4.2.2.	Wirkung von Cambinol und GW5074 auf Etoposid .....	- 55 -
4.2.3.	Wirkung von GW5074 auf die Vincristin-Behandlung .....	- 55 -
4.3.	JURKAT-ZELLEN .....	- 56 -
4.3.1.	Vorversuche .....	- 56 -
4.3.2.	Wirkung von GW5074 auf die Etoposid-Behandlung .....	- 59 -
4.4.	z-VAD-Experimente .....	- 60 -
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>- 61 -</b>
5.1.	Genexpressionsanalyse - SIRT5 als therapeutischer Angriffspunkt und prognostischer Marker in pädiatrischer ALL ..	- 61 -
5.2.	Korrelationen der Expression von Sirtuinen und p53 .....	- 64 -
5.3.	Monotherapie mit Sirtuin-Inhibitoren .....	- 66 -
5.4.	Wirkung von Sirtuin-Inhibitoren auf Zytostatikatoxizität.....	- 67 -
5.5.	Ausblick auf die weitere Forschung .....	- 68 -
<b>6.</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b> .....	<b>- 70 -</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>- 72 -</b>
7.1.	TABELLE 7 - SIRTUIN-EXPRESSION IN ASSOZIATION MIT KLINISCH- PATHOLOGISCHEN PARAMETERN .....	- 72 -
7.2.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	- 74 -
7.3.	TABELLENVERZEICHNIS .....	- 75 -
7.4.	LITERATURVERZEICHNIS .....	- 76 -
7.5.	DANKSAGUNG .....	- 84 -
7.6.	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	- 85 -

## 1. Zusammenfassung

Sirtuine (SIRT), die sieben Histondeacetylasen der Klasse III, sind eine neue, vielversprechende Gruppe antitumoraler Zielstrukturen. Ihre Hemmung unterbindet das Tumorwachstum und bewirkt die Induktion von Apoptose oder Differenzierungsprozessen. Klinische Studien mit HDAC-Inhibitoren zeigen dosisabhängige Nebenwirkungen. Diese könnten möglicherweise bei höherer Spezifität vermieden werden. Zielführend ist daher, die klinisch relevanten Isoenzyme zu identifizieren, um Voraussetzungen für eine gezielte Suche nach spezifischen Hemmstoffen zu schaffen. In vielen Tumoren erwachsener Krebspatienten wurden Assoziationen zwischen der Expression bestimmter SIRT-Isoenzyme und den klinischen Verläufen nachgewiesen. Im Bereich der pädiatrischen Onkologie liegen hierzu jedoch nur sehr wenige Daten vor.

In dieser Doktorarbeit sollte deshalb die klinische Relevanz von SIRT-Isoenzymen in kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) evaluiert werden. Dazu wurde in 89 kryokonservierten Proben von Patienten mit ALL mittels quantitativer Real-Time-RT-PCR die Expressionshöhe der sieben Sirtuinisoenzyme bestimmt. Die Analyseergebnisse wurden mit den Expressionsdaten von Knochenmarkzellen acht gesunder Spender verglichen und auf signifikante Korrelationen mit klinischen Parametern geprüft, insbesondere dem Gesamtüberleben und dem Auftreten von Rezidiven. Es zeigte sich, dass alle sieben Sirtuine in den Krebszellen signifikant höher exprimiert waren als in den gesunden Knochenmarkzellen. Signifikante Korrelationen fanden sich insbesondere bei SIRT5, einer mitochondrial lokalisierten Desuccinylase und Deacetylase, mit Einflussgrößen, die für ein schlechtes klinisches Ergebnis der Patienten sprechen. Im Detail waren dies ein Alter über neun Jahren, das Fehlen der ETV6-RUNX1 t(12;21)-Translokation und eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Rezidiven oder das Versterben der Patienten.

Es lässt sich vermuten, dass SIRT5 neben dem zellulären Metabolismus auch das Entstehen von ALL reguliert. Das Isoenzym könnte dadurch als neuer prognostischer Marker und als potentiellles Therapieziel dienen. Durch gezielte Inhibition von SIRT5 könnten gegebenenfalls neue spezifischere Therapiemöglichkeiten sowohl in Monotherapie als auch in Kombination mit



anderen Zytostatika in der Behandlung der häufigsten kindlichen Krebserkrankung etabliert werden.

Um den Einfluss von Sirtuininhibitoren auf die Vitalität von Leukämiezellen zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit in den ALL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat funktionelle Tests zur Beurteilung des Zelltodes durchgeführt. Dabei kamen der Hemmstoff GW5074, ein selektiver Inhibitor des SIRT5, und Cambinol, ein Inhibitor von SIRT1 und SIRT2, zum Einsatz. In der Monotherapie erwies sich GW5074 als effektiv. Durch Kombination mit dem Pancaspase-Inhibitor z-VAD konnte für GW5074 ein Caspase-unabhängiger, nicht-apoptotischer Zelltodmechanismus gezeigt werden.

Daran schlossen sich Experimente an, deren Ziel es war, mögliche synergistische Effekte einer Kombinationsbehandlung mit Etoposid und Vincristin auf die Einleitung des programmierten Zelltodes darzustellen. Die Inhibition von SIRT5 zeigte einen leichten additiven Einfluss auf die apoptotische Wirkung von Etoposid und einen stärkeren Einfluss auf Vincristin. Im Gegensatz dazu bewirkte Cambinol keinerlei relevante Effekte auf die Zytostatikawirkung in den kindlichen Leukämiezelllinien.

Die Ergebnisse dieser In-vitro-Arbeiten stellen eine erste experimentelle Grundlage für die Entwicklung SIRT-Isoenzym-selektiver Hemmstoffe zur Behandlung der ALL dar. Welche konkrete Funktion die sieben Sirtuine in kindlichen Leukämiezellen haben, bleibt jedoch ungewiss und bietet Möglichkeiten für weitere Forschung auf diesem Gebiet.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Akute lymphoblastische Leukämien (ALL)**

#### **2.1.1. Epidemiologie kindlicher Leukämien**

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 650 Kinder unter 15 Jahren an akuten Leukämien. Damit bilden diese Tumoren einen Anteil von etwa einem Drittel aller Malignome im Kindesalter von 0-14 Jahren (Spix et al. 2008). Jungen erkranken häufiger als Mädchen (Verhältnis 3:2). Etwa 85 % der Patienten erleiden eine akute lymphoblastische Leukämie (ALL) und 15 % eine akute myeloische Leukämie (AML).

#### **2.1.2. Definition und Ätiologie**

Trotz intensiver Forschung sind die Ursachen einer Leukämie noch nicht vollständig verstanden. Durch Mutationen und damit einhergehenden genetischen Veränderungen kann es zur zellulären Entartung sowie Aktivierung von Onkogenen kommen. Gesteigerte, unkontrollierte Proliferation, Fehldifferenzierung und Immortalität folgen (Pui et al. 2011).

Neben seltenen hereditären Syndromen (z.B. Fanconi-Anämie, Down-Syndrom), Virusinfektionen und Schwächung des Immunsystems z.B. durch HIV, EBV u.a., radioaktive Strahlung und bestimmten chemischen Substanzen (z.B. langjährige Benzolexposition), stehen verschiedene Medikamente (Immunsuppressiva, alkylierende Zytostatika, Chloramphenicol, Topoisomerase II-Inhibitoren) unter Verdacht, Leukämien auszulösen (Wiemels 2012).

Charakteristisch für akute Leukämien sind die ungehemmte Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen im Knochenmark und die gestörte Differenzierung der Leukozyten. Die heterogenen weißen Blutzellen sind relevanter Bestandteil des Immunsystems und erfüllen unterschiedlichste Funktionen. Leukämien sind klonale Erkrankungen. Bei der AML gehen die Tumorzellen aus granulozytären und monozytären Vorläuferzellen hervor. Hingegen entstehen ALL-Blasten aus lymphozytären Vorläuferzellen. Blasten, unreife Zellen, die die Fähigkeit zur Ausreifung verloren haben, akkumulieren im Knochenmark und in lymphatischen Organen und infiltrieren

später das periphere Blut (Chen et al. 2010, Pui et al. 2008). Dieser mehrstufige Prozess bewirkt, dass gesunde Zellen des blutbildenden Markes verdrängt werden und die normale Hämatopoese nicht mehr stattfinden kann. Die obligaten Knochenmarkfunktionen versagen und die Patienten gelangen in den Zustand der hämatopoetischen Insuffizienz und Anämie. Beeinträchtigungen von Sauerstofftransport, Infektabwehr und der Blutstillung folgen.

### **2.1.3. Symptomatik und Diagnostik**

Bei akuten Leukämien treten initial erfahrungsgemäß plötzlich („akut“) grippeähnliche Symptome wie Fieber, schweres Krankheitsgefühl, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Zahnfleisch- und Nasenbluten, Atemwegsinfekte sowie Knochen- und Gliederschmerzen auf. Je nach Stärke der leukämischen Oranginfiltrationen können sich Symptome wie z.B. Oberbauchbeschwerden bei Leber- und Milzvergrößerung, Lymphknotenschwellungen, Hautblutungen, Luftnot und Reizhusten bei Lungenentzündungen, Schwindel, Übelkeit, Photosensibilität, Kopf- und Nackenschmerzen bei Befall der Hirnhäute (Meningeosis leucaemica), Hodenschmerzen bei testikulärem Befall oder Sehstörungen bei Netzhautinfiltration zeigen (Information des DKFZ).

Symptomatik, klinischer Untersuchungsbefund und Blutbildanalyse weisen auf eine Leukämie hin. Eine Knochenmarkpunktion dient der Sicherung der Diagnose. Neben der mikroskopischen Analyse (Knochenmarkausstrich) wird eine immunologische Charakterisierung der blastären Oberflächenproteine vorgenommen, um die akute myeloische von der akuten lymphatischen Leukämie zu unterscheiden. Zum Nachweis prognostisch relevanter Chromosomenbrüche werden bei allen Leukämieformen außerdem Chromosomenuntersuchungen durchgeführt. Bedeutungsvoll sind molekulare Markeruntersuchungen und Immunphänotypisierung bei ALL. Durch diese Analysen ist es möglich, die ALL-Patientenproben in verschiedene Gruppen zu unterteilen: B-Vorläufer-ALL, Pro-B-ALL, Common-ALL (C-ALL), Prä-B-ALL, B-ALL (ca. 75-85% der Fälle) und T-ALL (ca. 15-25% der Fälle) (Pui et al. 2001, Pui et al. 2011).

### 2.1.4. Therapie der ALL und Prognose

Bei der Behandlung kindlicher Leukämien haben sich Konzepte intensiver zytostatischer, risikoangepasster Therapien als hochwirksam erwiesen, wobei grundsätzlich Polychemotherapien vorgenommen werden, um die Ausbildung von Resistenzen gegen Einzelsubstanzen zu vermeiden und wirkstoffspezifische Nebenwirkungen zu reduzieren (Pui et al. 2011). Diese Polychemotherapien umfassen gegenwärtig Anthrazykline, Vincaalkaloide, Epipodophyllotixine, Alkylantien, Methotrexat, L-Asparaginase und Cytosin-arabinosid, Glukokortikoide, 6-Mercaptopurin sowie 6-Thioguanin (Moricke et al. 2008, Pui et al. 2011).

Das Behandlungskonzept besteht aus 4 Phasen:

- Induktionstherapie (Ziel: Remission)
- Konsolidierungstherapie (Ziel: weitere Leukämiezellreduktion)
- Reinduktionstherapie (Ziel: erneute Therapieintensivierung)
- Erhaltungstherapie (Dauertherapie, Ziel: Vernichtung ruhender Leukämiezellen)

Zusätzlich zu klassischen Zytostatika gibt es spezifischere Therapieansätze. Seit einigen Jahren stehen monoklonale Antikörper (Rituximab, Alemtuzumab) der Krebstherapie zur Verfügung. Der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib wird zum Beispiel zur ALL-Therapie verwendet, insofern eine BCR-ABL-Fusion vorliegt (Chen et al. 2009).

Leukämie rezidive lassen sich besonders im Knochenmark, in ZNS, Hoden, Ovarien, Haut, Lymphknoten und Auge lokalisieren. Zur Prävention von Hirnhautinfiltration werden bei ALL-Patienten ergänzend zur normalen und intrathekalen Chemotherapie auch strahlentherapeutische Behandlungen durchgeführt (Richards et al. 2013). Neben supportiven Maßnahmen (Infektionsprophylaxe, Einsatz hämotopoetischer Wachstumsfaktoren, gezielte Blutkomponenten-Therapie u.a.) ist die Knochenmarktransplantation mit eigenen oder fremden Stammzellen (autologe bzw. allogene KMT) von großer Bedeutung. Der Erfolg ist abhängig vom individuellen Risikostatus. ALL-Patienten mit einer Höchsttrisikoleukämie profitieren stark von einer Familien- oder Fremdspendertransplantation. (Pui et al. 2011)

Risikofaktoren, die für eine deutlich schlechtere Prognose prädisponieren, sind männliches Geschlecht, ein Alter unter einem Jahr oder über 9 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose, eine initial hohe Leukozytenanzahl, T-Zell-ALL, initiale Hepatosplenomegalie, ZNS-Infiltration, Induktionsversagen, schlechtes Ansprechen auf Prednison sowie keine Remission am 33. Tag (Pui et al. 2011). Prognostisch günstige Faktoren sind das Vorliegen einer chromosomalen Hyperdiploidie sowie das Vorliegen der Translokation t(12;21)(p13;q22). Dies ist die häufigste genetische Aberration in kindlicher ALL und wird als TEL-AML1- oder ETV6-RUNX1-Fusion bezeichnet. Eine Studie von Bhojwani et al. legt dar, dass nahezu alle Kinder mit dieser Mutation von der Leukämie geheilt werden können und ein deutlich besseres Outcome aufweisen (Bhojwani et al. 2012).

Als Indikator für das Therapieansprechen und für die Rezidivwahrscheinlichkeit dient die Ermittlung der minimalen Resterkrankung (MRD = minimal residual disease) (Rubnitz et al. 2010). Denn trotz Therapie und KMT können einige Tumorzellen im Körper des Patienten verbleiben und zu einem Rezidiv, d. h. einem erneuten Auftreten der Leukämie, führen.

Über Jahrzehnte hinweg sind die Leukämiebehandlungen in fortlaufenden Therapieoptimierungsstudien sehr erfolgreich verbessert worden. Während in der Zeit vor 1950 eine akute Leukämie grundsätzlich tödlich verlief, liegen bei den im vergangenen Jahrzehnt behandelten Kindern die 5-Jahres-Überlebensraten in Deutschland inzwischen bei etwa 85 % für die ALL und bei etwa 60 % für die AML (Pui et al. 2011). Die Remissionsraten belaufen sich bei der ALL um die 95 % und 90 % bei AML.

Bei all diesen Erfolgen ist die erste Behandlung bei einem Viertel aller Patienten nicht erfolgreich und es muss weiter nach Möglichkeiten gesucht werden, Therapieergebnisse zu optimieren. Langzeitstudien an Überlebenden kindlicher Krebserkrankungen zeigen außerdem schwere therapiebedingte Spätfolgen (Yeh et al. 2010) und ein deutlich erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines neuen Primärtumors (Friedman et al. 2010). Deshalb sollten neue therapeutische Konzepte in der pädiatrischen Onkologie sowohl den Behandlungserfolg weiter verbessern, als auch Therapiedauer, Nebenwirkungen und Langzeitfolgen reduzieren. In Hinblick auf DNA-schädigende Zytostatika und deren potentiell krebsinitiierende

Nebenwirkung ist deren adäquate Substituierung durch weniger DNA-schädigende Wirkstoffe empfehlenswert. Zukünftig erscheint der Einsatz epigenetischer Wirkstoffe viel versprechend, da deren antitumorale Effekte auf einem neuen Wirkungsprinzip beruhen. Während die herkömmlichen Zytostatika durch Modifizierung von Biomolekülen in Krebszellen zumeist Apoptose auslösen, greifen epigenetische Modulatoren in einen der Krebsentstehung zugrunde liegenden Mechanismus ein (Jones und Baylin 2007, Esteller 2008, Taby und Issa 2010).

## **2.2. Funktion und Inhibition von Histondeacetylasen**

### **2.2.1. Epigenetik in der Kanzerogenese**

Bisher galten Mutationen als Ursache von Tumorerkrankungen. Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass nicht nur Aberrationen von DNA-Sequenzen für die Onkogenese verantwortlich sind, sondern auch epigenetische Veränderungen dazu beitragen (Jones und Baylin 2007, Esteller 2008). Epigenetische Modifikationen verändern die primäre DNA-Struktur nicht und besitzen den Vorteil, dass sie sich, anders als Mutationen, reversibel verhalten können. Mit geeigneten Medikamenten ist es daher vorstellbar, krebserzeugende epigenetische Mechanismen zu regulieren und Tumoren damit ursächlich zu behandeln (Esteller 2008).

Ein wichtiger an der Kanzerogenese beteiligter epigenetischer Mechanismus ist die DNA-Methylierung (Jones und Baylin 2007). Dabei werden in den Promoter-Regionen von Genen Cytosinreste methyliert. Dies hat in der Regel die Inaktivierung des betreffenden Gens zur Folge. Von derartigen Inaktivierungen können z. B. Tumorsuppressorgene betroffen sein. Zur Behandlung von myeloproliferativen Erkrankungen sind zwei DNA-Methylierungshemmstoffe zugelassen: das Azacitidin in Europa und den USA zur Therapie der AML und des Myelodysplastischen Syndroms sowie das Decitabin in den USA zur Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms (Taby und Issa 2010).

Histonacetylierung stellt einen weiteren onkogenetisch relevanten Mechanismus dar (Glozak und Seto 2007). Sie bewirkt eine Auflockerung des Chromatins und damit eine erhöhte Genexpression. Umgekehrt führt

Deacetylierung durch Chromatinkondensierung zu verringerter Genexpression. Das dynamische Gleichgewicht des Acetylierungsgrades des Chromatins wird durch die gegensätzlichen Enzymaktivitäten der Histonacetyltransferasen (HAT) und der Histondeacetylasen (HDAC) reguliert. In Studien konnte belegt werden, dass eine reduzierte Histonacetylierung in humanem Krebsgewebe mit fortgeschrittenem Tumorstadium und erhöhter Tumordinvasion korreliert (Song et al. 2005, Toh et al. 2004). So kann die medikamentöse Hemmung der HDAC mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) eine deutliche Veränderung der Genexpression in Krebszellen bewirken (Yoo und Jones 2006).

### **2.2.2. Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi)**

Der antineoplastische Wirkmechanismus dieser neuen Gruppe epigenetischer Modulatoren unterscheidet sie von etablierten Zytostatika. In Abhängigkeit von Tumortyp, Wirkstoff und dessen eingesetzter Konzentration entfalten HDACi auf Krebszellen verschiedene Wirkungen: Sowohl in vitro als auch in vivo hemmen sie das Tumorstadium, lösen Apoptose aus, induzieren Differenzierungsvorgänge, inhibieren die Angiogenese und wirken immunstimulatorisch (Xu et al. 2007). Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht verstanden. Aufgrund ihrer Eigenschaft, einen transformierten Phänotyp wieder rückgängig machen zu können, wurde das Forschungsinteresse an HDACi geweckt (Marks und Breslow 2007). Studien zeigten, dass Krebszellen häufig einen verminderten Histonacetylierungsgrad sowie eine reduzierte transkriptionelle Aktivität aufweisen, und dass diese Situation mit HDACi verändert werden kann (Yoo und Jones 2006). Ferner legen neuere Arbeiten dar, dass HDACi nicht nur die Acetylierung der Histone verstärken, sondern auch die Acetylierung anderer Proteine, deren Aktivität damit ebenfalls reguliert wird (Buchwald et al. 2009).

In den USA und Japan sind bereits zwei HDACi, Vorinostat (auch bekannt als Suberoylanilid-Hydroxamsäure, SAHA) und Romidepsin (Depsipeptid oder FK288), zur Behandlung kutaner T-Zell-Lymphome zugelassen (Taby und Issa 2010). Weitere HDACi befinden sich in der klinischen Erprobung (Slingerland et al. 2014, Stimson et al. 2009). In Kombination mit

Radiotherapie oder anderen Chemotherapeutika treten synergistische Effekte auf (Drummond et al. 2005). Inzwischen lässt der klinische Einsatz der HDACi toxische Nebenwirkungen erkennen, wobei diese als milder eingestuft werden als die der meisten Zytostatika (Ma et al. 2009).

### **2.2.3. Tumorspezifische HDAC**

Vermutlich beruhen die dosislimitierenden Nebenwirkungen von HDACi auf deren unselektiver Hemmung mehrerer HDAC-Isoformen. Die spezifische Inhibition der tumorrelevanten HDACs birgt den potentiellen Vorteil, behandlungsbedingte Nebenwirkungen zu reduzieren (Balasubramanian et al. 2009). Die HDAC sind eine Familie von 18 Isoenzymen, die in vier Klassen eingeteilt werden. Die elf  $\text{Zn}^{2+}$ -abhängigen Isoenzyme der Klassen I, II und IV (HDAC1-11) werden relativ unspezifisch von HDACi inhibiert (Lane und Chabner 2009). Die Entwicklung HDAC-Isoform-selektiver Hemmstoffe bietet die Möglichkeit, bei einer Behandlung unnötige Nebenwirkungen zu vermeiden. Hierzu ist die Identifizierung tumorrelevanter HDAC-Isoenzyme wichtig. Dabei können sich jedoch verschiedene HDAC-Isoformen in unterschiedlichen Tumorentitäten dominant verhalten. In letzter Zeit sind anhand von Patientenproben zahlreiche Krebsarten auf ihre HDAC-Expression untersucht worden.

Durch Korrelation der HDAC-Expressionsdaten mit den klinischen Verläufen haben sich beispielsweise beim Magen- und beim kolorektalen Karzinom hohe Expressionswerte der HDAC2 als prognostisch ungünstig herausgestellt (Weichert et al. 2008a, Weichert et al. 2008b). Inzwischen konnten für viele andere Krebsarten bei erwachsenen Patienten signifikante Korrelationen zwischen den Expressionswerten bestimmter HDAC-Isoenzyme und den klinischen Verläufen aufgezeigt werden (Weichert 2009). Aus der pädiatrischen Onkologie liegen aktuell erst vier derartige Studien vor. Es wurden ungünstige klinische Verläufe für das Neuroblastom bei hoher Expression der HDAC8 (Oehme et al. 2009), für das Medulloblastom bei erhöhter HDAC5 und HDAC9 (Milde et al. 2010) und bei der ALL bei hoher Expression der HDAC3, HDAC7 und HDAC9 (Moreno et al. 2010) und erhöhter HDAC4 (Gruhn et al. 2013) nachgewiesen.

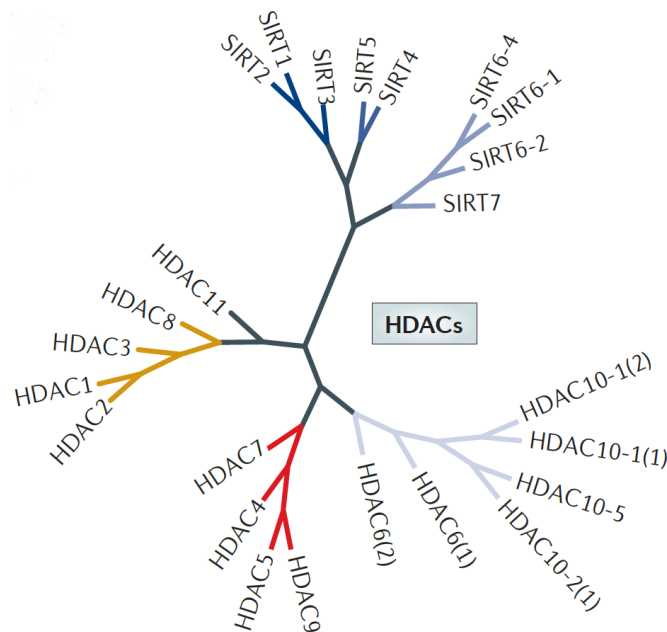


## 2.3. Sirtuine

### 2.3.1. Definition der Sirtuine

Während die Rolle der HDAC1-11 in Neoplasien inzwischen gut untersucht ist (Arrowsmith et al. 2012, Spiegel et al. 2012, Lane und Chabner 2009), ist der Erkenntnisstand zu den 7 Isoenzymen der Klasse III, den Sirtuinen (SIRT1-7), bei Krebs noch begrenzt (Baur et al. 2012).

Zunächst ein Wort zur Nomenklatur: Es gehören zwar alle 18 Isoformen der HDAC-Familie an, doch ist es in der neueren Literatur üblich geworden, nur die elf Isoformen der Klassen I, IIa, IIb und IV als "HDAC" zu bezeichnen und die sieben Isoformen der Klasse III davon als "Sirtuine" oder "SIRT" abzugrenzen. Im Weiteren wird dieser Konvention gefolgt. In Abbildung 1 ist eine phylogenetische Gliederung der Histondeacetylasen dargestellt (Arrowsmith et al. 2012).



**Abb. 1: Phylogenetische Gliederung der HDAC und SIRT**

Sirtuine, abgeleitet von dem Sir2 (Silent information regulator 2) in Hefen, unterscheiden sich biochemisch von klassischen HDAC, die als Kofaktor  $Zn^{2+}$  nutzen, durch ihre Abhängigkeit von  $NAD^+$  und ADP-Ribosylase. Pharmakologisch unterscheiden sie sich darin, dass Sirtuine nicht von Inhibitoren der HDAC1-11 gehemmt werden (Roth und Chen 2013). In Analogie zur HDAC/SIRT-Nomenklatur werden daher die Inhibitoren der HDAC1-11 als "HDACi" und Inhibitoren der SIRT1-7 als "SIRTi" bezeichnet.

### 2.3.2. Funktion und Lokalisation

Die sieben Sirtuine weisen eine homogene katalytische Domäne auf. Neben dieser Gemeinsamkeit haben die Isoenzyme unterschiedliche enzymatische Aktivitäten, zelluläre Lokalisationen (s. Tab. 1) und ein vielfältiges Substratspektrum (Baur et al. 2012).

SIRT	Enzymatische Aktivitäten	Lokalisation	Hauptfunktionen
SIRT1	Deacetylase	Zellkern	Metabolismus, Inflammation
SIRT2	Deacetylase	Zytosol	Zellzyklus, Motilität
SIRT3	Deacetylase	Mitochondrien (Zellkern)	Fettsäure-Oxidation, Antioxidative Effekte
SIRT4	ADP-Ribosyltransferase	Mitochondrien	Insulinsekretion, Inhibition der Fettsäure-Oxidation
SIRT5	Deacetylase und Deacylase	Mitochondrien	Harnstoff-Zyklus
SIRT6	Deacetylase und ADP-Ribosyltransferase	Zellkern	Genomstabilität, Metabolismus
SIRT7	Deacetylase	Nukleolus	Transkription ribosomaler DNA

**Tab. 1: Vergleich der Sirtuine**

Neben Histonen modifizieren Sirtuine auch Nichthistone. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass diese Enzyme nicht nur deacetylieren, sondern auch Myristoyl-, Succinyl- und Malonyl-Gruppen entfernen können. Soweit bekannt verfügen nur SIRT5 und 6 über diese Funktion, welche größtenteils in den Metabolismus involviert ist (Du et al. 2011, Jiang et al. 2013).

Sirtuine befähigen Organismen, durch Aktivierung verschiedener Signalwege auf metabolischen und oxidativen Stress zu reagieren. Die vielfältigen Funktionen lassen sich in vier regulative Prozesse einteilen: Chromatin-Regulation, zelluläres Überleben unter Stressbedingungen, metabolische Homöostase sowie zelluläre Entwicklung und Differenzierung. Forschungsergebnisse des vergangenen Jahrzehntes, die unter anderem auf Knockout-Modellen der sieben Sirtuine in Mäusen beruhen, deuten darauf hin, dass der Erhalt der genomischen Integrität zu den wichtigsten Funktionen der Sirtuine gehört (Bosch-Presegue und Vaquero 2013). Fehlende energetische Balance ist mit vielen humanen Pathologien assoziiert. Da Sirtuine in diesen zellulären Antworten eine entscheidende Rolle spielen, werden sie mit Krebs, kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Bosch-Presegue und Vaquero 2011).

Desweiteren regulieren Sirtuine zelluläre Alterungsprozesse wie Seneszenz und Apoptose. Studien belegen, dass Sirtuine die Fähigkeit besitzen, die zelluläre Lebensdauer zu verlängern und die positiven Effekte einer Kalorienrestriktion zu bewirken (Rogina und Helfand 2004, Wood et al. 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass der im Rotwein enthaltene Sirtuin-Aktivator Resveratrol neben kardioprotektiven und pleiotropen Effekten (»Französisches Paradoxon«) auf Zellen lebensverlängernd und chemopräventiv wirkt (Hung et al. 2000). Mit Ausnahme von SIRT4 und 5 sind alle Sirtuine durch Deacetylierung an derartigen Prozessen sowie an der Rekrutierung und Modifikation entscheidender Faktoren wie p53, p73, FOXO, Nf-kB, E2F1, Rb, BCL6, Notch und Ku-70 beteiligt (Bosch-Presegue und Vaquero 2011, Luo et al. 2001, Vaziri et al. 2001). Vor dem Hintergrund dieser Funktionen haben Sirtuine das Potential, als prognostische Marker und neue Angriffspunkte für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Erkrankungen des Alters (z.B. Parkinson-, Alzheimer-Krankheit, Diabetes mellitus) sowie in der Tumorthherapie zu dienen (Bosch-Presegue und Vaquero 2011).

### **2.3.3. Sirtuine und Tumorgenese**

Genomische Instabilität und die damit einhergehende Tendenz, vererbare genetische Veränderungen zu akkumulieren, sind Motor in der Entwicklung von Krebszellen (Sieber et al. 2003). Versuche mit Knockout-Mäusen von SIRT1-4 und 6 zeigten deutlich gesteigerte Genominstabilität, die sich in DNA-Schäden, fehlerhafter DNA-Reparatur sowie chromosomalen Aberrationen äußerte. Desweiteren kam es in vier dieser Sirtuin-Knockout-Versuche zu spontaner Tumorgenese. Die Ausnahme bildete SIRT1 (Bosch-Presegue und Vaquero 2013).

Hanahan und Weinberg stellten die fundamentalen Mechanismen der Krebsentstehung dar (Hanahan und Weinberg 2011). Dazu gehören die Erhaltung der Teilungsfähigkeit, Immortalität, Invasion und Metastasierung sowie die Induktion der Angiogenese. Zusätzlich besitzen kanzeröse Zellen die Fähigkeit Tumorsuppressormechanismen zu überwinden. Dies geschieht, indem sie wachstumsunterdrückenden Signalen und dem Zelltod ausweichen. Grundlage dieser Tumorkennzeichen ist die genetische Instabilität von Krebszellen.

Die Rolle der Sirtuine in der Tumorgenese ist sehr vielgestaltig. Einerseits vermag SIRT1 die Funktion des Tumorsuppressor-Proteins p53 zu hemmen (Luo et al. 2001, Vaziri et al. 2001). Zudem wurde in Biopsien von Patienten mit verschiedenen Tumoren eine signifikante Überexpression von SIRT1 beobachtet, z. B. beim Prostatakarzinom (Huffman et al. 2007), beim hepatozellulären Karzinom (Chen et al. 2011) und beim Magenkarzinom (Cha et al. 2009). Andererseits wiesen Darmkrebs- und Brustkrebs-Biopsien verringerte SIRT1-Expressionen auf (Kabra et al. 2009, Wang et al. 2008). In Hinblick auf SIRT2-7 wurden erhöhte Werte von SIRT3 und SIRT7 in Brustkrebs-Biopsien gefunden (Ashraf et al. 2006), während für SIRT2 beim Gliom (Hiratsuka et al. 2003) und für SIRT4 bei Erwachsenen-AML (Bradbury et al. 2005) reduzierte Expressionen nachgewiesen wurden. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung von Sirtuinen in Tumoren gibt eine aktuelle Publikation, die eine wesentliche Funktion von SIRT7 bei der neoplastischen Transformation aufzeigt (Barber et al. 2012).

Die zitierten Arbeiten weisen darauf hin, dass Sirtuine entscheidende, komplexe Funktionen bei Krebs besitzen. Sie zeigen aber auch, dass eine Überexpression der Sirtuine nicht grundsätzlich ein ungünstiger Faktor ist. Dies ist anders als bei den HDAC1-11, bei denen eine erhöhte Expression fast ausnahmslos mit schlechter Prognose korreliert (Weichert 2009). Folglich können Sirtuine sowohl die Tumorgenese fördern als auch supprimieren. Dies ist abhängig von der untersuchten Sirtuin-Isoform, den beeinflussten Genen, dem Krebsstadium und kontextbezogenen Variablen wie Ursprungsgewebe, zelluläres und umgebendes Milieu sowie experimentelle Bedingungen (Roth und Chen 2013). Um die Bedeutung der Sirtuine in Tumoren aufzuzeigen, ist es also unerlässlich, die Expressionen der sieben Isoenzyme individuell in den verschiedenen Tumortypen zu analysieren. Aus der pädiatrischen Onkologie liegt gegenwärtig erst eine derartige Studie zur Expression von SIRT1 im Medulloblastom vor (Ma et al. 2013). Klinische Befunde sind indes noch rar, und das Wissen über die Expression spezifischer Sirtuine ist besonders in kindlichen Tumoren wie Leukämien sehr limitiert. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden erstmalig die für die kindliche ALL relevanten Sirtuin-Isoformen identifiziert.

### 2.3.4. Sirtuinisoformen und deren Effekte in Tumoren

#### ***Sirtuin 1***

Das am besten untersuchte Sirtuin ist SIRT1. Die Literatur belegt sowohl onkogene als tumorsuppressive Wirkungen (s. Tab. 2). Veränderungen der SIRT1-Genexpression in Krebszellen werden über verschiedene Mechanismen vermittelt, die Transkription, Translation und posttranslationale Modifikation betreffen (Roth und Chen 2013). SIRT1 ist fähig, durch Deacetylierung p53 zu inaktivieren und führt damit zur Suppression der p53-abhängigen Apoptose (Luo et al. 2001). Da p53 an der tumorbiologischen Regulation entscheidend beteiligt ist, sind die HDACs der Klasse III ein aussichtsreicher Angriffspunkt für neue Krebstherapien. Studien belegen, dass die Inhibition von SIRT1 und SIRT2 zu einer Reaktivierung von p53 führt, was die tumorsuppressive Wirkung des Transkriptionsfaktors vermittelt (Olmos et al. 2011). Außerdem unterdrückt p53 an sich die SIRT1-Transkription (Nemoto et al. 2004).

Eine SIRT1-Überexpression blockiert die stressinduzierte Apoptose und Seneszenz durch Chromatinveränderung und Deacetylierung von FOXO, E2F1, Rb, Bcl6 und Ku70 führt (Heltweg et al. 2006, Wang et al. 2006). Im Gegenzug vermag SIRT1 unter extremen Bedingungen, wenn es zu chronischem Stress oder dem Überschreiten eines bestimmten Levels zellulärer oder DNA-Schädigung kommt, den programmierten Zelltod zu induzieren. Das weist auf eine komplexe, dynamische Funktion dieses Proteins im Überleben von Zellen hin (Bosch-Presegue und Vaquero 2013).

Die NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. SIRT1 deacetyliert Histone H4 am Lysin 16 (H4K16) sowie H3K9, H3K14 und weitere Histone. Diese Histonmodifikationen führen zu Gen-Silencing (Stilllegung z.B. von Tumorsuppressorgenen) und Heterochromatinformation (Imai et al. 2000). Eine globale Genomhypoacetylierung am H4K16 ist besonderes Kennzeichen humaner Krebszellen sowohl in Zellkultur als auch in Patientenproben (Fraga et al. 2005).

Darüber hinaus konnten Yuan *et al.* darlegen, dass BCR-ABL die Expression von SIRT1 in hämatopoetischen Vorläuferzellen aktiviert und dies das CML-Zellüberleben, onkogene Transformation und damit Leukämieentstehung fördert. Bei Versuchen zum SIRT1-Knockout in Mäusen wurde die

Suppression der Entstehung CML-ähnlicher Erkrankungen bewiesen. Desweiteren wurde in Arbeiten mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib BCR-ABL gehemmt, dadurch die SIRT1-Expression reduziert und die Apoptose eingeleitet. Damit ist Imatinib äußerst wirksam in der CML-Behandlung und SIRT1 neues tumortherapeutisches Ziel. Schlussfolgernd führt sowohl die pharmakologische Inhibition von SIRT1 als auch dessen Knockout zur Unterdrückung der Leukämie-Entstehung. Diese Studien bilden einen ersten Beweis für eine kausale Funktion von veränderter SIRT1-Expression in der onkogenen Transformation und Progression einer Leukämie (Yuan et al. 2012).

In Abhängigkeit von Tumorart, zellulärem und molekularem Kontext wirkt Sirtuin 1 auch tumorsuppressiv. Es verbessert die genetische Stabilität normaler Zellen und unterdrückt Tumorgenese. Beispielsweise vermindert eine Überexpression dieses Enzyms die intestinale Tumorentstehung bei adenomatöser Polyposis coli (APC) durch Deacetylierung und Inaktivierung von  $\beta$ -Catenin und Veränderung im onkogenen Wnt-Signalweg. Die  $\beta$ -cateninabhängigen Gene sind u.a. wichtig für Zellzyklusregulation und Proliferation und können bei Mutation zur Entstehung von Darmkrebs führen (Firestein et al. 2008). Desweiteren inhibiert SIRT1 den NF- $\kappa$ B-Signalweg, der Inflammation, Zellüberleben, Proliferation und Metastasierung bewirkt. Die SIRT1-Aktivität verstärkt über diesen Weg der NF- $\kappa$ B-Hemmung die TNF- $\alpha$ -vermittelte Apoptose (Yeung et al. 2004).

Neue Erkenntnisse deuten an, dass es einen zuvor unterschätzten Signalweg für die Genominstabilität und Entstehung von Krebszellen gibt. Dieser beschreibt die Anreicherung von Mutationen durch gesteigerte Ungenauigkeit bei der DNA-Reparatur. Dies hat wichtige biologische Signifikanz für die Medikamentenresistenz von Tumoren (Wang et al. 2013). SIRT1 scheint das Zentrum dieses Prozesses zu sein (Roth und Chen 2013). Die detaillierten Mechanismen müssen in Zukunft genauer erforscht werden.

<b>Tumorsuppressor</b>	<b>Onkogen</b>
- Erhöhte genomische Stabilität - Chromatin und DNA-Reparatur (Stunkel et al. 2007)	- Inhibition von Seneszenz u. Apoptose - Förderung des Zellwachstums - Hemmung der Zelldifferenzierung (Bradbury et al. 2005, Bosch-Presegue und Vaquero 2011, Roth und Chen 2013)
- Stressantwort, Stressresistenz (Bosch-Presegue und Vaquero 2013)	
- Metabolismus u. Homöostase - Limitation der replikativen Lebensspanne (Herranz et al. 2010, Baur et al. 2012)	- Angiogenese u. Metastasierung (Potente und Dimmeler 2008, Potente et al. 2007)
	- Chemoresistenz (Chu et al. 2005)

**Tab. 2: SIRT1 als Tumorsuppressor und Tumorpromotor**

### **Sirtuin 2**

SIRT2 hat viele Gemeinsamkeiten mit SIRT1 und eine ambivalente Funktion in der Tumorgenese. Das Enzym ist primär als NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase charakterisiert. Obwohl es hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert ist, kann sich SIRT2 auch in den Zellkern verlagern. Dort deacetyliert es H4K16 während der Mitose, H3K56 und viele Nicht-Histon-Substrate (Roth und Chen 2013). Einerseits wirkt SIRT2 in Gliomen (Hiratsuka et al. 2003) und Melanomen (Lennerz et al. 2005) als Tumorsuppressor und ist in diesen vermindert exprimiert. Andererseits fördert SIRT2 onkogene Phänotypen. Eine erhöhte Expression findet sich in AML-Zellen. Eine SIRT2-Inhibition löst in den leukämischen Zellen in vitro Apoptose aus (Vaquero et al. 2006). Knockdown von SIRT2 induziert p53-Akkumulation und führt zur Apoptose von Krebszellen (Peck et al. 2010).

### **Sirtuin 3**

SIRT3 ist die Hauptdeacetylase der Mitochondrien mit einem großen Substratspektrum (Lombard et al. 2007). Es reguliert den Metabolismus ( $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren, Citratzyklus u.a.), die energetische Homöostase, Thermogenese und mitochondriale Biogenese. Das Enzym kann aber auch im Zellkern vorkommen und deacetyliert dort H4K16 und H3K9, um deren Transkription zu unterdrücken (Roth und Chen 2013). SIRT3 agiert als Tumorsuppressor. Dies belegte eine Studie mit SIRT3-Knockout-Mäusen, bei denen es zu gesteigerter Brustkrebsbildung kam (Kim et al. 2010). Die tumorsuppressive Wirkung lässt sich durch Modulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidative Wirkung, z.B. durch Aktivierung

der Superoxid-Dismutase und Steigerung der Glutathionlevel, begründen (Roth und Chen 2013). Finley et al. stellten fest, dass rund 20 % aller humanen Krebsproben und 40 % von Brust- und Ovarialkrebsproben SIRT3-Deletionen enthalten (Finley et al. 2011). Jedoch gibt es auch Studien, die das Gegenteil darstellen und Krebszellen Wachstumsvorteile durch SIRT3-Aktivität zuschreiben. SIRT3-Level sind in oralen Plattenepithelkarzinomen erhöht (Alhazzazi et al. 2011). Ektopische SIRT3-Expression wirkt dem p53-induzierten Zellzyklusarrest und Seneszenz entgegen, was eine tumorfördernde Rolle von SIRT3 offenbaren würde (Li et al. 2010). Wie SIRT1 kann SIRT3 Ku70 deacetylieren und dadurch dessen Interaktion mit Bax erleichtern. Dadurch wird die Bax-vermittelte Apoptose abgeschwächt (Sundaresan et al. 2008).

### ***Sirtuin 4***

SIRT4 ist eine mitochondriale ADP-Ribosyltransferase ohne bekannte Deacetylase-Aktivität, dessen primäre Funktion in der Regulation des Stoffwechsels liegt. Es gibt keine Studien, die die Rolle von SIRT4 in Tumoren evaluieren (Roth und Chen 2013). Aber es konnte gezeigt werden, dass SIRT4-Level in AML durchweg erniedrigt sind (Bradbury et al. 2005).

### ***Sirtuin 5***

Das mitochondriale SIRT5 ist das wohl Ungewöhnlichste der Sirtuine, weil es nicht nur deacetylieren kann, sondern auch Malonyl- und Succinyl-Gruppen von Ziellysinen entfernt (Du et al. 2011). Das Substratspektrum dieser Modifikationen ist unbekannt. Die Orte der Demalonylierung und Desuccinylierung überschneiden sich nicht mit Acetylierungsstellen. Erstere Modifikationen befinden sich an C-terminalen Proteindomänen, während letztere am N-terminalen Ende der Substrate liegen. Dies spricht für unterschiedliche Regulationswege und epigenetische Wirkungen. Die Analysen von Park et al. haben ergeben, dass die Proteindesuccinylierung besonders Enzyme des mitochondrialen Stoffwechsels beeinflusst. Beispiele sind der Citratzyklus, Aminosäureabbau und Fettsäuremetabolismus. Es gibt auch zytosolische und nukleäre succinylierte Enzyme. In der Studie konnte auch eine extramitochondriale SIRT5-Fraktion nachgewiesen werden. SIRT5



unterdrückt die biochemischen Enzymaktivitäten und die Zellatmung durch Modifikation zweier Proteinkomplexe: den Pyruvatdehydrogenasekomplex und die Succinatdehydrogenase (SDH) (Park et al. 2013). Hauptsubstrate von SIRT5 sind die Carbamoylphosphat-Synthetase-1 (CPS1) und die Uricase. Damit beeinflusst das Enzym einerseits den entscheidenden Schritt des Harnstoff-Zyklus und andererseits den Purinstoffwechsel (Ogura et al. 2010, Nakagawa et al. 2009). Deacetylierung der CPS aktiviert das Enzym. Dies fördert die Harnstoffproduktion und die Ausscheidung überschüssigen Ammoniaks. Obwohl die Succinylierung die Aktivität der CPS1 und der Isozitatdehydrogenase reguliert, ist bis jetzt nicht geklärt, wie die epigenetischen Modifikationen zelluläre Funktionen verändert. (Park et al. 2013). Dysregulierte SDH fördert die Anreicherung von Succinat und mitochondrialen ROS, die HIF1 $\alpha$  und Angiogenese aktivieren (Selak et al. 2005). Dadurch könnte SIRT5 Einfluss auf die Entstehung von Neoplasien haben. Es gibt jedoch keine Studien, die die Rolle von SIRT5 in der Tumorgenese evaluieren. Desweiteren ist nichts über dessen Funktionen in Zelltodmechanismen bekannt. Weitere Studien, die die umfassende Funktion von SIRT5 untersuchen, sind erforderlich.

### ***Sirtuin 6***

SIRT6 ist eine Chromatin-gebundene NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase und ADP-Ribosyltransferase. Wichtige Substrate sind H3K9 und H3K56. Dadurch ist es bei der DNA-Reparatur, dem Erhalt der Genomstabilität und im Metabolismus beteiligt (Roth und Chen 2013). Gesteigerte SIRT6-Expression induziert Apoptose in Krebszellen, aber nicht in normalen Zellen (Van Meter et al. 2011). In einer kürzlich erschienen Studie mit SIRT6-Knockout wurde für das Isoenzym eine offensichtlich tumorsuppressive Rolle belegt. Der Verlust von SIRT6 genügt, um in Mäusen immortalisierte embryonale Fibroblasten zu transformieren und andererseits die Darmkrebs-Inzidenz zu steigern. Des Weiteren wurde gezeigt, dass SIRT6 in humanen Tumorproben signifikant erniedrigt ist (Sebastian et al. 2012).

### ***Sirtuin 7***

SIRT7 ist primär Deacetylase und im Nukleolus lokalisiert. Hier reguliert es die Genexpression ribosomaler DNA über Aktivierung der RNA-Polymerase-1 (Ford et al. 2006). Das Isoenzym vermag auch in vitro und in vivo p53 zu deacetylieren. SIRT7-Verlust führt zu gesteigerter p53-vermittelter Apoptose (Vakhrusheva et al. 2008). Viele Arbeitsgruppen zeigten erhöhte SIRT7-Expressionen in Tumoren von Brust, Schilddrüse und Leber. SIRT7 scheint Krebszellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen (Roth und Chen 2013). SIRT7-Knockdown reduziert das Zellwachstum. Ein onkogener Mechanismus von SIRT7 ist die Deacetylierung von H3K18 (Barber et al. 2012). Interessanterweise weisen verschiedene Tumorentitäten globale Hypoacetylierung von H3K18 auf, was unter anderem mit einer schlechten Prognose in Prostatakarzinomen einhergeht (Seligson et al. 2009).

### ***Synopsis***

Generell sind Sirtuine an der zellulären Stressantwort, der DNA-Reparatur und dem Metabolismus beteiligt. SIRT1, 2 und 3 weisen sowohl tumorsuppressive als auch -fördernde Funktionen auf. SIRT6 hingegen ist rein tumorsuppressiv. Aufgrund der komplexen Funktionen und vielfältigen Substrate ist es Ziel der Forschung, spezifische Sirtuin-Aktivatoren und Inhibitoren für bestimmte therapeutische Zwecke zu entwickeln (Roth und Chen 2013).

## **2.4. Sirtuininhibitoren**

### **2.4.1. GW5074**

Das Indol GW5074 stellte sich in einer großen Testreihe von Sirtuininhibitoren als potenter Inhibitor der SIRT5-Desuccinylase heraus. 100 µM GW5074 reduzierten die Desuccinylaseaktivität um ca. 15 %. GW5074 ist einer der ersten SIRT5-Inhibitoren mit geeigneten pharmakologischen Eigenschaften. Mit dieser Substanz ist eine erste Grundlage für die Entwicklung SIRT5-spezifischer Hemmstoffe identifiziert worden. Interessanterweise zeigten sich geringere Effekte in der Beeinflussung der Deacetylasefunktion von SIRT5 (Suenkel et al. 2013).

### **2.4.2. Cambinol**

Cambinol ist ursprünglich als Substanz beschrieben, die die Aktivität von SIRT1 und SIRT2 vermindert. In einer Studie, in der die Effekte von Cambinol in Mäusen und humanen Immunzellen untersucht wurden, erweiterte sich das Wissen über das Substratspektrum. Cambinol inhibiert die Expression von Zytokinen (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, and IFN- $\gamma$ ), NO und CD40 in Makrophagen, dendritischen Zellen, der Milz und Blutzellen. Sirtinol, ein Inhibitor von SIRT1 und SIRT2, der strukturell dem Cambinol ähnelt, reduzierte auch die Antwort der Makrophagen auf die TLR-Stimulation und die Immunantwort bei Infektionen. Cambinol reduziert die TNF $\alpha$ -Level im Blut und verbessert das zelluläre Überleben im endotoxischen und septischen Schock. Damit besitzt der Wirkstoff antientzündliche und protektive Eigenschaften und hat potentielle klinische Relevanz in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. Auf molekularer Ebene mindert Cambinol die stimulusinduzierte Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) und MEKs. Diese zum MAP-Kinase-Weg zählenden Enzyme regulieren Proliferation, Genexpression, Differenzierung, Mitose, Zellüberleben und Apoptose uvm. (Lugrin et al. 2013).

Darüber hinaus besitzt Cambinol als Inhibitor zweier HDAC der Klasse III antineoplastische Aktivität und könnte als neues Medikament in Chemotherapien dienen (Medda et al. 2009). Der Transkriptionsregulator BCL6 wird von SIRT1 deacetyliert. BCL6 wird im Keimzentrum von Lymphknoten exprimiert und supprimiert Gene, die in Zellzyklusregulation, Apoptose und Differenzierung involviert sind. Translokationen, die BCL6 enthalten, sind häufig in B-Zell-Lymphomen. Deacetylierung durch SIRT1 fördert die transkriptionsunterdrückende Aktivität von BCL6 und widersteht der Apoptose (Roth und Chen 2013). Cambinol wirkt in vitro und in vivo Lymphomen entgegen teils durch Erhalt der Acetylierung und Aktivierung von BCL6 (Heltweg et al. 2006).

Die Inhibition von SIRT1 durch Cambinol hat einen zytostatischen und proliferationsmindernden Effekt auf hepatozelluläre Karzinomzellen (HCC) in vitro und wirkt der Tumorbildung in vivo entgegen (Portmann et al. 2013). Auch in Versuchen an Brustkrebszellen (Holloway et al. 2013) zeigte

Cambinol tumorreduzierende und supprimierende Effekte. Weitere Tests mit Cambinol in Hinblick auf dessen tumortherapeutische Wirkungen sind nötig.

## **2.5. Zytostatika**

### **2.5.1. Etoposid**

Etoposid ist ein Podophyllotoxin, das ursprünglich aus dem Amerikanischen Maiapfel (*Podophyllum peltatum*) isoliert wurde. Da Etoposid unter anderem antineoplastische Wirkungen in AML, Non-Hodgkin-Lymphomen, Neuroblastomen, Magen- Mamma-, Bronchialkarzinomen sowie verschiedenen Sarkomen entfaltet, wurde es 1983 durch die FDA (engl.: Food and Drug Administration) als Chemotherapeutikum zugelassen (Hande 1998, Martincic und Hande 2005). Etoposid ist das erste Topoisomerase II-inhibierende Krebsmedikament (Hande 1998). Die Topoisomerasen sind nukleäre Enzyme, die für die Chromosomenkondensation, Chromosomen-segregation sowie DNA-Replikation essentiell sind. Im Vergleich zu der Topoisomerase I, die in der DNA Einzelstrangbrüche einfügt, verursacht die ATP-abhängige Topoisomerase II DNA-Doppelstrangbrüche. Die Veränderung der Tertiärstruktur des Biomoleküls soll dessen Verdrehung und Knotenbildung verhindern (Nitiss 2009). Nach Modifikation der DNA-Topologie erfolgt die Religierung beider Stränge und die Herstellung der Genomintegrität. Etoposid verhindert diese Verbindung zum Doppelstrang. Dadurch werden Signalkaskaden, die den Zellzyklusarrest sowie die Apoptose einleiten, stimuliert (Martincic und Hande 2005).

### **2.5.2 Vincristin**

Das natürlich vorkommende Vinca-Alkaloid Vincristin wird aus der rosafarbenen Catharanthe (*Catharanthus roseus*) gewonnen. Vincristin wird seit den 1960er Jahren erfolgreich in der Therapie von ALL, NHL, Ewing-Sarkomen, Melanomen, Mammakarzinomen sowie ZNS-Tumoren eingesetzt. Als Mitosehemmstoff blockiert es den Aufbau des Spindelapparates. Kernspindeln bestehen aus röhrenförmig angeordneten Tubulindimeren, sogenannten Mikrotubuli. Vinca-Alkaloide inhibieren durch Bindung der Dimeruntereinheiten deren Aggregation. Dabei bindet Vincristin an  $\beta$ -Tubulin. Dies verhindert die Polymerisation mit  $\alpha$ -Tubulin. Die

Kernspindel kann nicht ausgebildet werden, was folglich zur Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase führt. Die Zellen verlieren ihre Teilungsfähigkeit und schließlich wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Überdies sind Mikrotubuli Teil des Zytoskeletts. Sie erfüllen Funktionen des intrazellulären Stofftransports, der Erhaltung der Zellform, Zellbewegung sowie des axonalen Transports. Neurotoxizität ist daher eine typische Nebenwirkung einer Vincristintherapie (Gidding et al. 1999).

### **2.6. Zielstellung der Arbeit**

Sirtuine sind aufgrund ihrer komplexen Aktivitäten in zellulären Signal- und Stoffwechselwegen eine interessante Enzymgruppe, wobei viele ihrer Funktionen indes noch ungeklärt sind. Nachgewiesen ist, dass Sirtuine sowohl Einfluss auf tumorsuppressive als auch -fördernde Mechanismen nehmen.

Seit Jahren bearbeitet die Arbeitsgruppe von Prof. Beck und Dr. Sonnemann Fragestellungen zu tumorbiologischen Wirkungen von HDACi auf verschiedene Arten von Krebszellen. Der Schwerpunkt liegt dabei auf klinisch nutzbaren Kombinationswirkungen von HDACi mit anderen tumortherapeutischen Prinzipien. Es ist weitgehend ungeklärt, welche spezifischen HDAC-Isoenzyme bei HDACi-induzierten Sensibilisierungen wesentlich sind (Witt et al. 2009). In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Histondeacetylase-Aktivität in pädiatrischen ALL- und AML-Proben im Vergleich zu mononukleären Zellen (MNC) aus gesundem Knochenmark und peripherem Blut erhöht ist (Sonnemann et al. 2012). Aus diesem Ergebnis stellte sich die Frage, welche HDAC-Isoenzyme besonders erhöht sind, um daraus mögliche therapeutische Angriffspunkt und neue prognostische Marker für Leukämien zu etablieren. In einem weiteren Projekt wurden die ALL-Proben daher in Hinblick auf die Expression der elf HDACs der Klassen I, II und IV analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine erhöhte HDAC4-Expression mit prognostisch ungünstigen Faktoren, wie einem geringen Ansprechen auf Prednison und initiale Leukozytose, korreliert (Gruhn et al. 2013).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die klinische Relevanz der HDAC der Klasse III in kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämie zu evaluieren.

Ein möglicherweise unter den Isoenzymen existierendes Target für eine verbesserte Krebstherapie sollte durch Bestimmung der Genexpressionshöhe sowie Korrelation mit prognostischen Faktoren bzw. der Überlebenswahrscheinlichkeit und dem Auftreten von Rezidiven identifiziert werden.

Aufbauend auf diese Daten erfolgten funktionelle Analysen unter Einsatz spezifischer Hemmstoffe, GW5074 und Cambinol, und geeigneter Kombinationsexperimente. Die Sirtuininhibition wurde mit verschiedenen Zelltod-Assays in den ALL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat charakterisiert.

Die Resultate dieses Projekts sollten die tumorbiologische Funktion der Sirtuine in kindlichen Leukämien etablieren. Dadurch legen sie eine erste Grundlage für die Entwicklung Sirtuin-gerichteter Wirkstoffe zur Behandlung der häufigsten Krebserkrankung bei Kindern.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

Die aufgeführten Materialien und Chemikalien wurden über die Universitätsapothek Jena oder direkt von den Herstellern bezogen, die in der rechten Spalte gezeigt sind,

##### 3.1.1. Allgemein verwendetes Material und Geräte

Accu-jet® Pipette Controller	BrandTech® Scientific
BBD 6220 CO2 Brutschrank	Thermo Scientific
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer	BD Biosciences
BD Falcon™ Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Bioscience
BioPhotometer plus	Eppendorf
Cellstar® Zellkulturplatten 6/96 Well	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH
Cellstar® Kulturflasche 5/20 ml	Greiner bio-One GmbH
Cellstar® Serologische Pipette, 1/2/5/10 ml	Greiner Bio-One GmbH
Combitips Plus 1,0/2,5/5,0/10,0/25,0 ml	Eppendorf
Durchflusszytometer FACSCanto II®	Becton Dickinson Company
Einfrierautomat TRA-14	Cryoson, Schöllkrippen
Eisbereiter	Nordcap
Eppendorf Reference®	Eppendorf, Hamburg
Fast Real-Time PCR System (7900 HT)	Applied Biosystems
FLUOstar Omega, multi-mode microplate reader	BMG LABTECH GmbH
HERA safe KS 12, Sterilwerkbank	HERAEUS Thermo Scientific, Hanau
CO <sup>2</sup> -Inkubator BBD6220 (37 °C; 5 % CO <sub>2</sub> )	HERAEUS Thermo Scientific, Hanau
Kryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH
Mikroskop	Carl Zeiss Jena , Leica
Mikrozentrifuge	Labaratory & Medical Supplies
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer (Improved)	Assistent Germany, Bad Blankenburg
Nitrilhandschuhe	Rösner-Mautby Meditrade
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
Pasteur-Plastikpipetten, 3 ml	Greiner Bio One, Ratiolab GmbH
pH Elektrode	Mettler Toledo

## Material und Methoden

Pipetten Eppendorf Reference variabel 0,5-10, 10-100, 50-200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Präzisions-Quarzküvette	Hellma, VWR International
Safe Lock Röhrchen 0,5/1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
SPSS Statistics (PAWS)	SPSS Inc. IBM
Thermal Reactor	Biometra
Vortex-Genie®2	Scientific Industries, Inc., New York
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo
Zellzähler Counter AC-15	Karl Hecht AG
Zentrifuge Rotanta/TR	HETTICH, Bäch, Schweiz
7900 HT Fast RT-PCR System®	Applied Biosystem
4 °C Kühlschrank, -20 °C Gefrierschrank	

### 3.1.2. Reagenzien und Kits

BD™Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Bioscience
Cambinol, 25 mM Stammlösung	Apotheke Universitätsklinikum Jena
Caspase-3-Substrat (Ac-DEVD-AMC)	Bachem
Descosept AF, Desinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
DiOC6(3) (3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid), Endkonzentration: 50 nM	Molecular Probes
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	PAA Laboratories
Essigsäure, 0,1 %	Carl Roth
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Etoposid, 50 mM Stammlsg.	Alexis
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutamin	PAA Laboratories
Glycerin	Merck
GW5074, 25 mM Stammlösung	ENZO
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl) -ethansulfonsäure)	SIGMA
Meliseptol® HBV Desinfektionstücher	B. Braun Melsungen
Mini-Plasco® connect, Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen



## Material und Methoden

PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	PAA Laboratories
Penicillin G/Streptomycin	PAA Laboratories
Propidiumiodid, Stammlsg: 1 mg/ml Endkonzentration: 2 µg/ml	SIGMA, St. Louis, USA
RNase OUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
RPML-1640 mit stabilem Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Triton X-100	SIGMA
Trypanblau 0,5 % (w/v) in PBS	Biochrom AG, Berlin
Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 1x/10x	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Vincristin, 10 µM Stammlsg.	Hexal AG
ZVAD (Pancaspase-Inhibitor), 20 mM SLsg.	Apotheke Universitätsklinikum Jena

Omniscript® RT Kit QIAGEN	QIAGEN
pegGOLD DNase I Digest Kit	Peqlab
RNeasy® Mini Kit (250)	QIAGEN
QIAshredder™ (250)	QIAGEN
TaqMan® Gene Expression Assay (Primer-Sonden, Universal PCR Master Mix)	Applied Biosystems

### 3.1.3. Zelllinien

**CCRF-CEM** Humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie, 1964 etabliert aus dem peripheren Blut eines dreijährigen kaukasischen Mädchens mit akuter lymphoblastischer Leukämie in terminalem Rezidiv

Morphologie: teiladhärente Zellen, die als runde vereinzelte Zellen in Suspension und adhärent als monomolekulare Schicht wachsen

Depositor: Dr. H. G. Drexler, ACC 240, Lot 6. - 20.03.2009, Braunschweig, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)

Inkubation: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

**Jurkat** Humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie, die 1976 aus dem peripheren Blut eines vierzehnjährigen, an ALL erkrankten Jungen im ersten Rezidiv isoliert wurde.

Morphologie: runde Zellen, die vereinzelt oder in Zellhaufen in Suspension wachsen

Depositor: Dr. Jun Minowada, ACC 282, Lot 15. 31.08.2009, DSMZ

Inkubation: 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>

### 3.1.4. Medium und Puffer

- Komplettmedium für CCRF-CEM und Jurkat:

500 ml - 90%	RPMI-1640 [mit stabilem Glutamin]
50 ml - 10%	Fetales Kälberserum
100 units pro ml	Penicillin G
0,1 mg/ml	Streptomycin

- Caspase-3-Lysepuffer (für 50 ml)

20 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (= saurer Puffer)	
20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (=basischer Puffer)	
→ 20 ml NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 80 ml Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,5): 25 ml		
100 mM	Tris-HCl (ph 7,5):	5 ml
1 M	NaCl:	6,5 ml
100 mM	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> :	5 ml
100 %	Triton-X 100:	0,5 ml
(mit aqua dest. auf 50 ml auffüllen (pH 8,1)		
mit ca. 100 µl 9 % HCL pH 7,5 einstellen)		

- Caspase-3-Aktivitätspuffer (110 µl á Probe, für 7 Proben ≈ 1 ml)

1 M	HEPES:	0,02 ml
100 %	Glycerin:	0,1 ml
	aqua dest.:	0,828 ml

kurz vor Applikation lichtgeschützte Zugabe von:

1 M	DTT:	0,002 ml
50 µg/ml	Caspase-3-Substrat:	0,05 ml (photosensibel!)

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Genexpressionsanalyse mit quantitativer Real-Time-PCR**

Um eine Genexpressionsanalyse durchführen zu können, war es zunächst erforderlich, die gesamte RNA der Patientenproben zu isolieren und photometrisch zu bestimmen. Nach cDNA-Transkription mit Omniscript® erfolgte eine quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (PCR). Während des Arbeitsprozesses wurde generell mit Handschuhen, sterilen wattierten Pipettenspitzen, sterilen Reaktionsgefäßen und sterilem RNase-freien Wasser gearbeitet, um Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

#### **3.2.1.1. Auftauen kryokonservierter Proben und RNA-Isolation**

Die Lagerung der 89 initialen ALL-Patientenproben und der 8 mononukleären Knochenmarkzellen gesunder Spender erfolgte in -180 °C flüssigem Stickstoff. Die Aliquots wurden unter Bewegung im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und der Inhalt unmittelbar in ein 15 ml Tube mit 10 ml PBS-Puffer überführt. Die Suspensionen wurden im vorgekühlten Gerät 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Mit dem RNeasy Mini Kit (250) von QIAGEN® erfolgte die RNA-Isolation. Die Methode wurde auf Eis durchgeführt. Durch Zugabe von 350 µl bzw. 600 µl RLT-Puffer (je Sedimentgröße) wurde das trockene Zellpellet lysiert, daraufhin das komplette Lysat auf eine DNA-Removing-Säule überführt und für 2 min mit 13000 U/min zentrifugiert. Nach Entfernung der Säule wurde der Unterstand mit dem gleichen Volumen (350 µl oder 600 µl) an 70 % Ethanol vermengt und auf eine PerfectBind-RNA-Säule gegeben und für 15 sec zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 600 µl in zwei Schritten. Der Unterstand wurde verworfen. Die RNA war nun in dem Filter der Säule gebunden. Mit 350 µl Waschpuffer RW1 wurden die Säulen 5 min bedeckt. Zur Entfernung der übrigen DNA wurde der pegGOLD DNase I Digest Kit verwendet. Das Enzymgemisch des DNase-Verdaus wirkte 20 min ein. Anschließend folgten weitere Wasch- und Zentrifugationsschritte mit 350 µl Waschpuffer RW1 sowie zweifach mit 500 µl RPE. Zum Schluss wurde die RNA mit 35 µl oder mehr RNase-freiem Wasser für 1 min zentrifugiert und somit eluiert.

### 3.2.1.2. Photometrische RNA-Bestimmung

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes und einer Qualitätsbeurteilung wurden photometrische Messungen der einzelnen Proben durchgeführt. Diese fanden in einer standardisierten Quarzküvette mit einem Messvolumen von 80 µl statt. RNase freies Wasser wurde zum Kalibrieren des Photometers und als Verdünnungsmittel (1:20) für je 4 µl Probenmaterial eingesetzt. Eine Absorptionseinheit entsprach 40 µg RNA/ml. Die RNA-Konzentration (µg/µl) einer Probe berechnete sich demzufolge aus  $\text{Absorption}_{260\text{nm}}$  multipliziert mit 40 und dem Verdünnungsfaktor.

Um Rückschlüsse auf den Reinheitsgrad ziehen zu können erfolgte gleichzeitig eine Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen bzw. deren aromatischen Aminosäureresten. Von einer sauberen Nukleinsäure-Lösung spricht man, wenn der Quotient beider Absorptionswerte ( $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ) zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Kleinere Werte deuten auf Kontamination hin. Danach wurde die isolierte RNA entweder bei -20°C eingefroren oder direkt weiter verarbeitet.

### 3.2.1.3. cDNA-Transkription mit Omniscript®

Durch die revolutionäre Identifizierung des Enzyms Reverse Transkriptase ist es möglich, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben.

Mit einem Kit der Firma QIAGEN® wurde pro Probe 1 µg cDNA synthetisiert. Mit RNase-freiem Wasser wurde das benötigte RNA-Volumen auf ein Gesamtvolumen von 26 µl aufgefüllt und mit 14 µl eines Mastermixes für 60 min in einem Heizblock bei 37 °C inkubiert. Die entstandene cDNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Mastermix-Rezeptur je Probe: (\* im Omniscript® RT Kit (QIAGEN) enthalten)

- 4 µl 10x Buffer-RT\*
- 4 µl dNTP-Mix\*
- 4 µl Random-Hexamer (*eigene Synthese*)
- 0,5 µl RNase Inhibitor (*Invitrogen*)
- 2 µl Omniscript Reverse Transkriptase\*

Ein RNase-Inhibitor hemmt die Zerlegung der RNA durch RNasen. Die cDNA wird durch die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität der Reversen Transkriptase entlang eines RNA-Templates synthetisiert. Weiterhin baut das Enzym durch seine Ribonuklease-Aktivität (RNase H) die hybridisierte RNA ab. Das Ergebnis der Transkription ist einzelsträngige cDNA.

### **3.2.1.4. TaqMan®-Real-Time-PCR**

Eine weitere Methode, die die Arbeit in Laboratorien revolutioniert hat, ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Möglichkeit der schnellen Vervielfältigung von Nukleinsäuren ist zu einem unverzichtbaren Standardverfahren geworden. War dies zunächst ein kostspieliges, aufwändiges Procedere, erlebte die PCR mit Entdeckung der hitzestabilen DNA-Polymerasen einen großen Fortschritt. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die „Real-Time“ PCR (RT-, Echtzeit-PCR) simultan effektive Vervielfältigung und sensitiven Nachweis der PCR-Amplifikate. Bewirkt wird dies durch den Einsatz fluorogener Sonden, die 1993 von Lee et al. entwickelt wurden. Proportional zum Anstieg der Produktmenge erhöht sich die Intensität des Fluoreszenzsignals. Anhand der Gesamtfluoreszenz ( $\Delta R_N$ -Wert) kann die amplifizierte DNA-Menge beurteilt werden. Dem Fluoreszenzsignal liegt ein Prinzip der räumlichen Trennung zweier Farbstoffe zugrunde. In der vorliegenden Arbeit wurde die TaqMan®-Methodik genutzt. Dabei ist die TaqMan-Sonde am 5'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (z. B. TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) und an ihrem 3'-Ende mit einem Reporterfarbstoff (Fluorochrom VIC™ oder FAM™) markiert. Durch strahlungsfreie Fluoreszenz-Resonanz-Energieübertragung (FRET) supprimiert der Quencher das Fluoreszenzsignal.

Primer und Sonden binden sequenzspezifisch an die cDNA. Mittels ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität ist es der hitzestabilen *Taq*-Polymerase möglich, im Laufe der Elongation des Gegenstranges das fluorogene Oligonukleotid vom 5'-Ende aus Base für Base zu hydrolysieren. (Holland et al. 1991). Dadurch entfernt sich das Fluorophor von dem Quencher, der Energietransfer wird unterbrochen und ein Anstieg der sequenzspezifischen Reporterfluoreszenz ist zu detektieren.

Die Durchführung der quantitativen RT-PCR erfolgte mit dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystem sowie der Software SDS 2.2.2. Entsprechend dem Ein-Schritt-Protokoll der Gold RT-TaqMan®-PCR liefen in einem Reaktionsgefäß Reverse Transkription und Polymerisation unmittelbar hintereinander ab. Für die Amplifikation wurde die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase verwendet, eine chemisch modifizierte Variante der rekombinanten DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die bei Raumtemperatur inaktiv ist. Somit war eine Enzymaktivierung vor der PCR notwendig, die 10 min bei 95 °C erfolgte.

Für jede Probe (25 µl) sowohl für das Ziel-Gen als auch das Referenz-Gen wurde ein Mastermix pipettiert. Dieser enthielt:

- 11,25 µl RNase-freies Wasser
- 12,5 µl Universal PCR Mastermix
- 1,25 µl Primer-Sonden-Mix (*Sirtuine*, *p53*, *p21*, *MDM2*, *MDM4*: FAM,  $\beta_2M$ : VIC-Fluoreszenzfarbstoff)

In den Reaktionsgefäßen wurden 2 µl cDNA der isolierten Patienten- bzw. Knochenmarkproben in 50 µl des Mastermixes aufgenommen. Davon wurden jeweils 25 µl in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Es erfolgte damit je Probe eine Doppelbestimmung.

Zusätzlich wurden auf der Platte für jedes Gen zwei Negativ-Kontrollen (NTC, *not template control*) mitgeführt. Diese enthielten den Mastermix ohne cDNA.

Folgendes PCR-Programm wurde in einem Thermocycler absolviert:

	<i>Phase</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Prozess</i>
	1.	95 °C	10 min	Aktivierung der TaqPolymerase
40 Zyklen	2.	95 °C	15 sec	Denaturierung der DNA
	3.	60 °C	1 min	Annealing – Anlagerung der Primersonden und Amplifikation

### 3.2.1.5. Auswertung der TaqMan® -RT-PCR

Nach Durchführung der RT-PCR wurde mittels der erhaltenen Fluoreszenzsignale eine relative Quantifizierung der in den Proben enthaltenen Templates vorgenommen. Diese ist nur in der exponentiellen Phase der PCR korrekt möglich, da in dieser Zeit optimale Reaktionsbedingungen vorliegen. Die Bestimmung der relativen Genexpressionen ( $\Delta\Delta C_T$ -Werte) erfolgte mittels der 2008 von Schmittgen und Livak publizierten  $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ -Methode

Zur Normalisierung der Expressionslevel diente als Referenzgen das zellulär konstitutiv und ubiquitär vorkommende  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2M$ ). Dieses sogenannte *housekeeping gene* wurde für jede Probe amplifiziert. Das Fluoreszenzsignal der internen Kontrolle diente zum Ausgleich der variierenden Ausgangsmengen der verwendeten RNA und ermöglicht somit einen relativen Mengenvergleich (Pfaffl et al. 2004). Des Weiteren vergleicht man die relative Expression der Proben mit Kontrollprobenmaterialien. Zur Evaluierung der Sirtuinisoenzym-Level in 89 ALL-Patientenproben wurden 8 Proben mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender (KM-MNC) gepoolt. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine Probe der Zelllinie CCRF-CEM mitgeführt.

Werden die detektierten Fluoreszenzintensitäten ( $\Delta RN$ ) im Vergleich zur Zyklusanzahl aufgetragen, stellt sich ein Amplifikationsplot dar (Abb. 2).

Außer der Hintergrundaktivität der Sonden (engl.: *baseline*) zeigen die Graphen einen linearen Anstieg. In diesen Kurvenabschnitt wird bei etwa zehnfachem Signalniveau gegenüber der *baseline* eine Schwelle (engl.: *threshold*) gelegt. Als Schwellenzyklus (engl.: *threshold-cycle* = CT) wird jener Zyklus bezeichnet, der diese Fluoreszenzintensität besitzt. Die CT-Werte dienen der RNA-Quantifizierung.

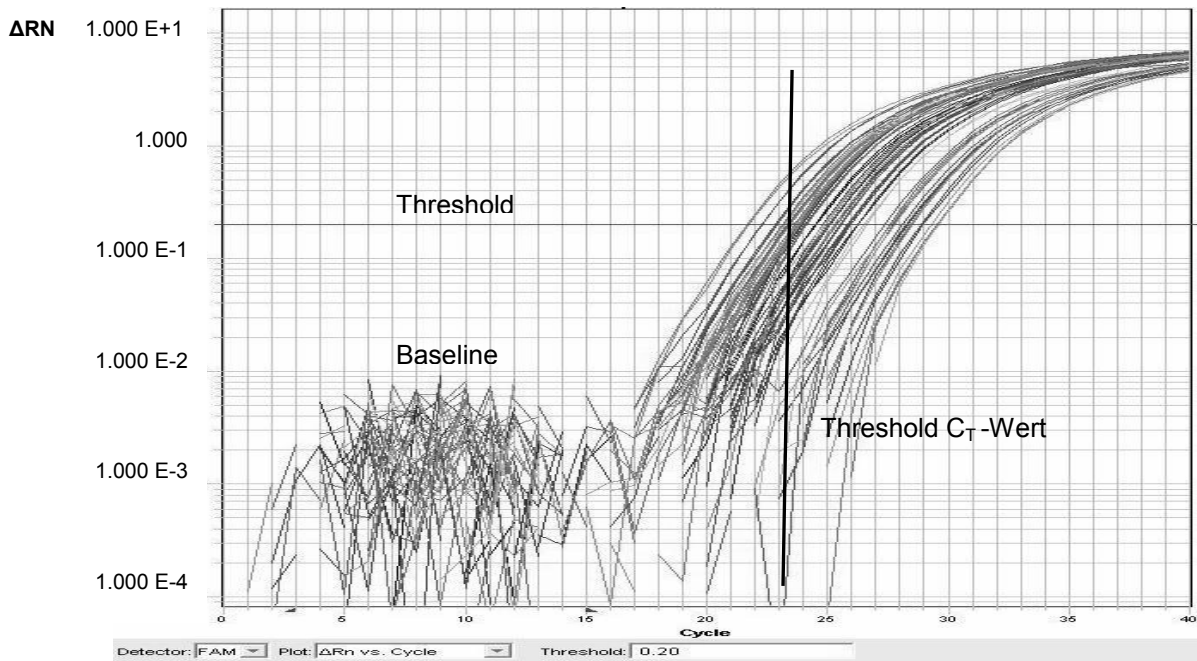
Die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T \text{ Zielsequenz (Sirtuin)} = \text{Sirtuin } C_T - \beta_2\text{-Mikroglobulin } C_T$$

$$\Delta C_T \text{ Kontrolle (KM-Pool)} = \text{Kontrolle } C_T - \beta_2\text{-Mikroglobulin } C_T$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielsequenz} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

Die  $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden als negativer Exponent zur Basis 2 angegeben. Als Kontroll- bzw. Bezugswerte wurden die Knochenmark-Pool-Angaben gleich 1 bzw. 100 % gesetzt. Aus den Daten der Doppelbestimmungen wurden Mittelwerte gebildet. Die  $C_T$ -Werte eines Probenansatzes besaßen eine SD < 0,5.



**Abb. 2: Amplifikationsdiagramm**

Dargestellt ist das Fluoreszenzsignal ( $\Delta R_n$ ) gegenüber der PCR-Zyklusanzahl. Im linear aufsteigenden Kurvenabschnitt ist ein Schwellenwert bei 0,2 eingezeichnet

### 3.2.2. Zellkultivierung

#### 3.2.2.1. Auftauen und Kultivieren der kryokonservierten Zellen

Die Lagerung der Zelllinien erfolgte in  $-196^\circ\text{C}$  flüssigem Stickstoff. Ein Aliquot mit dem Inhalt von einer Millionen Zellen wurde zum Ansetzen einer neuen Kultur im Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) aufgetaut. Die Zellen wurden unmittelbar unter der sterilen Werkbank in ein 15 ml Tube, welches mit 6 ml vorgewärmtem Komplettmedium gefüllt war, überführt. Im Anschluss erfolgte ein dreiminütiger Zentrifugationsvorgang bei 1200 U/min. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml frischen Komplettmedium resuspendiert und in eine unbeschichtete  $75\text{ cm}^2$ -Kulturflasche gegeben. Im  $37^\circ\text{C}$  warmen Brutschrank mit 5 %  $\text{CO}_2$ -Gehalt sowie 95 % Luftfeuchtigkeit wurden die Stammkulturen inkubiert. Diese wuchsen entweder ausschließlich in Suspension (Jurkat) oder teils in Suspension und teils



adhärent (CCRF-CEM). Für Versuche wurden Zellen der Passagen 4 bis 30 eingesetzt. Sabine Becker hat freundlicherweise das Auftauen der Kryokulturen übernommen.

### **3.2.2.2. Passagieren der Zellen**

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 85-95 % in der Kulturflasche entsprechend aller drei bis vier Tage passagiert. Arbeitend unter einer Sterilwerkbank von Thermo Scientific, wurde mit einer serologischen Pipette zunächst das alte Medium entfernt und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche wurde zweimal mit je 10 ml PBS gespült. Zur Ablösung der adhärenenten CCRF-CEM-Zellen wurde der Flaschenboden mit 2,5 ml 37°C warmem Trypsin/EDTA überschichtet und für 18 min inkubiert. Durch Zugabe von 7 ml RPMI-Medium wurde die Trypsin-Wirkung gestoppt und danach die Kulturflasche erneut mit 8 ml Medium gespült. Diese Ablösungsschritte entfielen bei der Suspensionszelllinie Jurkat. Anschließend wurde das gefüllte 50 ml Röhrchen für 3 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mittels Pipette in 15 ml frischem Medium gelöst, bis eine homogene Suspension vorhanden war.

### **3.2.2.3. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität**

Aus der Zellsuspension wurden 20 µl für die quantitative Zellbestimmung entnommen und mit 20 µl Trypanblau in einem Eppendorftube gemischt und kurz gevortext. Von dem 1:2 verdünnten Ansatz wurden 10 µl in eine Neubauerzählkammer pipettiert. In zwei der vier äußeren Quadrate, die je aus 16 Kleinquadraten bestehen, wurden unter einem Mikroskop die Zellen ausgezählt. Das Volumen eines Großquadrats beträgt 0,1 µL (1 mm Seitenkante x 1 mm Seitenkante x 0,1 mm Schichtdicke).

Die Vitalitätsbestimmung der Zellen erfolgte mit dem sauren Farbstoff Trypanblau, der sich nur in Zellen mit geschädigten Zellmembranen einlagert und damit den Zelltod in blaugefärbten Zellen anzeigt. Der Anteil vitaler, ungefärbter Zellen ergibt sich aus dem Quotienten lebender Zellen und der Gesamtzellzahl sowie Multiplikation mit 100 %. Die Multiplikation der

erhaltenen Zellzahl mit 10000 ermöglichte die Ermittlung der Anzahl der Zellen pro ml. Zur Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors von Trypanblau multipliziert man mit zwei und dividiert durch die Anzahl der Quadrate (in dem Fall durch zwei).

$$\text{Zellen pro 1 ml Zellsuspension} = \frac{\text{Zellzahl} \times 2 \times 10^4}{\text{Anzahl der Großquadrate}}$$

#### **3.2.2.4. Fortführen der Zellkultur**

Es wurde jeweils eine neue Kulturflasche mit gewünschter Zelldichte angelegt. Beim Passagieren wurden für den Zeitraum von Montag bis Freitag  $1,5 \times 10^6$  CCRF-CEM-Zellen bzw.  $3 \times 10^6$  Jurkat-Zellen eingesät, von Freitag auf Montag hingegen  $2,0 \times 10^6$  bzw.  $4 \times 10^6$  Zellen. Die gewünschte Sollzellzahl pro Flasche wurde durch die ermittelte Zellzahl dividiert. Das erhaltene Volumen wurde in eine sterile 75cm<sup>2</sup>-Kulturflasche eingesät, in der bereits Komplettmedium vorgelegt war. Insgesamt enthielt eine Flasche 20 ml Zellsuspension. Die Zellkultur wurde im 37°C Inkubator mit 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt sowie 95 % Luftfeuchtigkeit bis zum erneuten Passagieren aufbewahrt.

#### **3.2.2.5. Aussäen der Zellen für funktionelle Versuche**

Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung erfolgte das Aussäen der in warmem Medium suspendierten Zellen. Dazu wurde eine Verdünnung mit frischem Medium angesetzt. Für die PI/DiOC-Analysen wurden pro Well 150.000 Zellen eingesetzt. Hingegen wurden 200.000 Zellen zur Caspase-3-Aktivitätsbestimmung eingesät. Das einzusetzende Volumen berechnet sich aus dem Soll geteilt durch das Gezählte:

$$\frac{\text{Notwendiges Volumen (Anzahl Wells} \times 150.000 \text{ bzw. } 200.000 \text{ Zellen)}}{\text{In Neubauerkammer gezählte Zellzahl pro 1 ml}}$$

Die berechnete Menge wurde in ein 50 ml Tube pipettiert. In diesem war bereits die Menge an RPMI-Medium vorgelegt, die für ein Endvolumen von 2 ml pro Well benötigt wurde. Die Verdünnung wurde im Überschuss angesetzt. Mit Hilfe einer Multipette wurden pro Well einer 6-Well-Platte 2 ml ausgesät und wie gewohnt im Brutschrank für 24 h inkubiert. Vor den

Behandlungen erfolgte eine mikroskopische Überprüfung der Adhärenz und Dichte des Zellrasens.

### **3.2.2.6. Einfrieren und Lagern der Zellen**

Die langfristige Aufbewahrung von Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Zellen einer 80-95%ig konfluenten Kulturflasche wurden mit 2,5 ml Trypsin/EDTA wie oben beschrieben geerntet, in ein 50 ml Röhrchen pipettiert und 3 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellsediment in einem Gemisch aus RPMI-Medium mit 20 % FKS und 5 % DMSO resuspendiert. In die 1,5 ml Kryoröhrchen wurde je eine Million Zellen aliquotiert. Unter Verwendung eines Einfriersystems (Einfrierautomat TRA-14 „intelligent freezing chamber“, Cryoson, Software Biofreeze BV50, Consarctic GmbH) konnten die Zellen innerhalb von 50 min stufenweise auf -120°C gekühlt und anschließend im Container mit flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert werden.

Susan Wittig und Sabine Becker haben freundlicherweise das Einfrieren der Zellen übernommen.

### **3.2.3. Wirkstoffapplikation**

Alle Wirkstoffapplikationen sowohl die Vorbehandlung mit den Sirtuininhibitoren, die 24 Stunden nach Aussaat erfolgte, als auch die 4 Stunden später erfolgende Applikation von Etoposid oder Vincristin fanden unter sterilen Bedingungen und bei gedämpften Licht statt, da die Substanzen photosensibel sind. Nach Optimierung der verabreichten Dosis und der Inkubationszeiten wurden die Medikamente, wie in den Tabellen 3 bis 5 aufgezeigt, verabreicht. Als Verdünnungsmittel diente RPMI-Medium oder DMSO. In Kombinationsversuchen mit dem Pancaspase-Inhibitor z-VAD wurde eine einstündige Vorinkubation vorgenommen. Im Anschluss an die Zytostatikabehandlung wurden die Zellen je nach vorgesehenem Experiment entweder für 24 h zur Caspase-3-Aktivitätsbestimmung oder 48 h für anschließende durchflusszytometrische PI/DiOC-Messungen im Brutschrank inkubiert.

Vorbehandlung	Stammlösung	Verdünnungsmittel	Konzentration [ $\mu$ M]	IKZ
GW5074	25 mM	RPMI-1640	5, 10, 15	4 h
Cambinol	25 mM	DMSO	50	4 h
z-VAD	20 mM	RPMI-1640	20	1 h

**Tab. 3: Konzentrationen von GW5074, Cambinol und z-VAD für die Vorbehandlungen**

Die Konzentrationen sowie die optimalen Inkubationszeiten wurden durch eigene Dosis-Wirkungs-Vorversuche ermittelt.

Zytostatikum	Stammlösung	Verdünnungsmittel	Konzentrationsreihe [nM]	IKZ
Etoposid	50 mM	RPMI - Komplett- medium	0/10/30/100/300/1000/3000	48 h
Vincristin	10 $\mu$ M		0/0,5/0,75/1,25/2,5/5/10	24 h

**Tab. 4: Eingesetzte Zytostatikakonzentrationen**

Die Konzentrationsreihen und Inkubationszeiten der Zytostatika wurden nach Erfahrungswerten des onkologischen Forschungslabors unter der Leitung von J. Sonnemann sowie durch eigene Vorversuche bestimmt. Die gezeigten Konzentrationen wurden für die Kombinationsbehandlungen mit den zwei Sirtuininhibitoren verwendet.

Substanz	Stammlösung	Verdünnungsmittel	Konzentration
Etoposid	50 mM	RPMI-Komplettmedium	3 $\mu$ M
GW5074	25 mM	RPMI-Komplettmedium	25 $\mu$ M

**Tab. 5: Konzentrationen für z-VAD-Versuche**

Etoposid und GW5074 wurden nach einstündiger Vorbehandlung mit z-VAD wie angegeben auf die Kulturplatten pipettiert.

### **3.2.4. Funktionelle Tests**

#### **3.2.4.1. Caspase-3-Aktivitätstest**

##### **3.2.4.1.1. Hintergrund des Caspase-3-Aktivitätstestes**

Im Verlauf der Apoptose-Signalkaskade kommt es zur Aktivierung von Caspasen (engl.: *cysteine aspartate-specific proteases*). Diese Enzyme sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach Aspartat spalten. Als zentrales Effektorenzym kann die Caspase-3 über zwei Wege aktiviert werden. Sowohl extrinsisch durch Aktivierung von Todesrezeptoren und proteolytische Spaltung durch die Caspase-8, als auch intrinsisch über mitochondriales Cytochrom-c und Caspase-9. (Creagh et al. 2003) Die Substrate der Caspase-3 werden nach dem Asparaginsäure-Rest der Tetrapeptid-Erkennungssequenz (DEVD=Asp-Glu-Val-Asp) gespalten. Das löst neben der Degradierung des Zytoskellets (z.B. Aktin, Lamin) die Aktivierung weiterer Caspasen und Nukleasen und führt zu nukleärer DNA-Fragmentierung, morphologischen Veränderung und damit zur Bildung von *apoptotic bodies* (engl. apoptotische Körperchen). (Porter und Janicke 1999)

Durch das synthetische Substrat Ac-DEVD-AMC ist es möglich, die Caspase-3-Aktivität zu bestimmen. Das abgespaltene fluorogene Molekül AMC (1-Amino-4-methylcoumarin) emittiert mit einer Wellenlänge von 460 nm und hat eine Anregungswellenlänge von 355 nm. Die Aktivität der Caspase-3 korreliert mit der Fluoreszenz, die in einem Fluoreszenzphotometer ermittelt wurde, und ist ein effektiver Indikator für apoptotischen Zelltod.

##### **3.2.4.1.2. Durchführung des Caspase-3-Aktivitätstest**

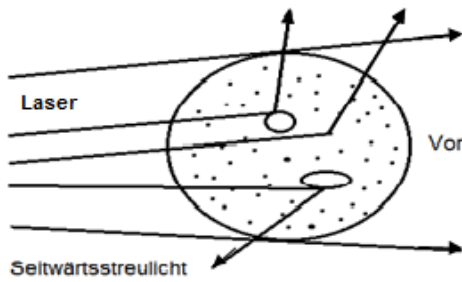
Mit einer Zellzahl von 200.000 Zellen je Well erfolgte die Aussaat der Zellen in Sechs-Well-Kulturplatten, so wie im Kapitel 3.2.2.5. beschrieben. Die Zellkultur wurde einen Tag später je nach Versuch vor- und behandelt (s. Kapitel 3.2.3.). Vierundzwanzig Stunden nach der Behandlung mit den Zytostatika fand die Ernte sowohl vitaler als auch toter Zellen statt. PBS und Trypsin/EDTA wurden vorher 15 min bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Zuerst wurde das Medium mit einer Einwegpasteurpipette in ein 15 ml

Röhrchen abgenommen und die adhärennten Zellen einmalig mit 1 ml PBS gespült. Mit je 500 µl Trypsin/EDTA pro Well wurden die Kulturplatten für 18 min unter oben genannten Bedingungen inkubiert. Dieser Ablösungsprozess entfiel bei der Suspensionszelllinie Jurkat. In der Inkubationszeit kühlte die Zentrifuge auf 4 °C herunter. Die Wells wurden erneut zwei Mal mit 1 ml PBS gespült. Die mit PBS auf 13 ml aufgefüllten Proben wurden 5 min mit 1800 U/min zentrifugiert. Nach vollständigem Verwerfen des Überstandes erfolgte das fünfzehnminütige Lysieren des Zellsediments mit 100 µl Lysepuffer. Die auf Eis gekühlten, lysierten Proben wurden mit je 110 µl frisch hergestelltem Caspase-3-Aktivitätspuffer sorgfältig vermengt und möglichst lichtgeschützt vollständig (210 µl) in ein Well einer 96-Well-Multititerplatte pipettiert. Das Ansetzen von Lyse- sowie Caspase-3-Aktivitätspuffers sind in Kapitel 3.1.4. erläutert. Die mit Alufolie umwickelte Platte wurde für zwei Stunden im Brutschrank bei oben genannten Bedingungen inkubiert.

Die Messung erfolgte bei 355/460 nm an einem Fluoreszenzphotometer. Auf der 96-Well-Platte wurde je Spalte ein Well mit aqua dest. sowie ein Leerwert aus 100 µl Lysepuffer und 110 µl Caspase-3-Aktivitätspuffer mitgeführt, um die Eigenfluoreszenz der Substrate zu ermitteln. Dieser Betrag wurde bei der Auswertung von den ermittelten Fluoreszenzen subtrahiert. Die Bestimmung der relativen Caspase-3-Aktivität ging so von der unbehandelten Probe aus.

### **3.2.4.2. Durchflusszytometrische Analysen**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem in einem kurzen Zeitintervall große Zellpopulationen hinsichtlich diverser molekularer und physikalischer Parameter beurteilt werden können. Die Zellen passieren einzeln nach Fokussierung in einer speziellen Quarzküvette in einem raschen Flüssigkeitsstrom einen monochromatischen Laserstrahl. Je nach Zellgröße, Struktur, Färbung und Fluoreszenz entstehen unterschiedliche optische Effekte. Proportional zur relativen Zellgröße ist das Vorwärtstreulicht (engl.: *forward scatter*, FSC), das durch die volumenabhängige Lichtbeugung entsteht. Hingegen gibt das Seitwärtstreulicht (engl.: *side scatter*, SSC) Aufschluss über die Granularität von Zellen, deren Vesikeln, Zellkern und damit deren innere Komplexität (Abb. 3).

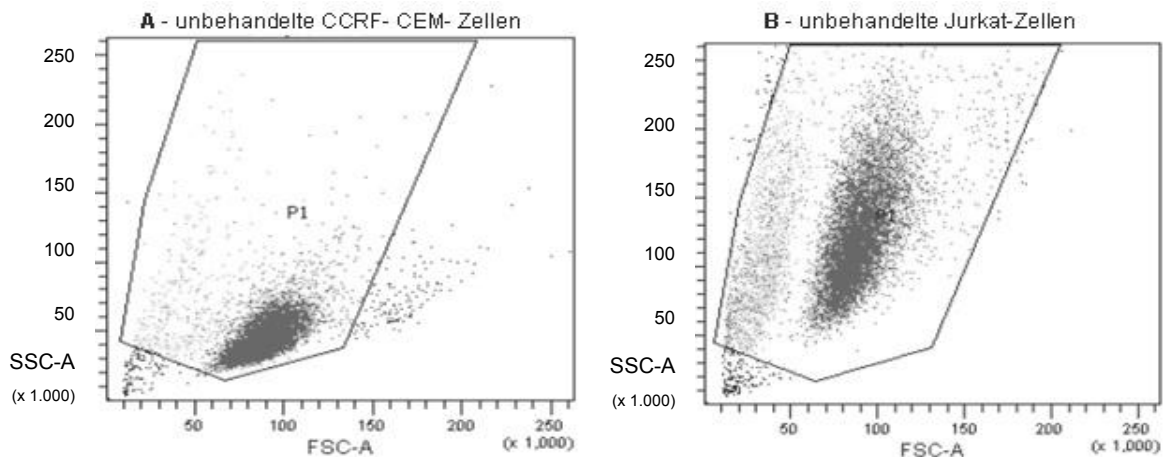


**Abb. 3: Lichtstreuungsarten einer Zelle**

Zur Seite reflektierte Lichtstrahlen korrelieren mit der intra- und extrazellulären Granularität. Das Vorwärtstreulicht gibt Hinweis auf die relative Zellgröße und wird durch Lichtstrahlen gebildet, die in ihrem Verlauf nach vorn abgelenkt werden.

Eine andere Bezeichnung der bewährten Technologie ist "FACS-Analyse". Dies ist eine Abkürzung für *fluorescence-activated-cell-scanner*, einem Fluoreszenz-aktivierten Zellscanner. Wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, können nach Energieanregung durch den Laser emittierte Signale sowie das Streulicht durch verschiedene Detektoren und Kanäle in entsprechender Wellenlänge registriert und quantitativ analysiert werden. Vorgeschaltete Filter erhöhen die Wellenlängenspezifität und dienen neben einem System aus Spiegeln dazu, emittierte Signale zu den Photodetektoren weiterzuleiten. Diese transformieren die Lichtreize in elektronische Signale.

In der vorliegenden Arbeit fanden die Durchführungen der Messungen an dem Gerät FACSCanto™ II der Firma Becton Dickinson GmbH statt. Mittels der BD FACSDiva Software (BD Bioscience, 2000) erfolgte die Datenanalyse der elektrischen Signale. Dadurch ist es unter anderem möglich, die gemessenen Zellen je nach Parametern in einem zweidimensionalen Koordinatensystem als einzelne Punkte darzustellen. Für die Datenauswertung wurden je drei Dotplots (FSC/SSC, FSC/PI, FSC/DiOC) und zwei Histogramme (PI/Counts, DiOC/Counts) erstellt. Die Punktwolke eines Dotplots entspricht einer gemessenen Zellpopulation. Zum Ausschluss von Zelltrümmern, Verunreinigungen und Dubletten, noch nicht vereinzelter Zellen, wird die Zellpopulation in der Analyse passend abgegrenzt. In der weiteren Auswertung wurde nur die Population 1 (P1) betrachtet. Zusätzlich limitierte ein auf den Parameter FSC gesetzter Schwellenwert von 10.000 die vom FACS ermittelte Ereignisanzahl. In Abbildung 4 sind Dotplots unbehandelter Zellen beider verwendeter Zelllinien, CCRF-CEM sowie Jurkat, in Abhängigkeit von ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) gezeigt.

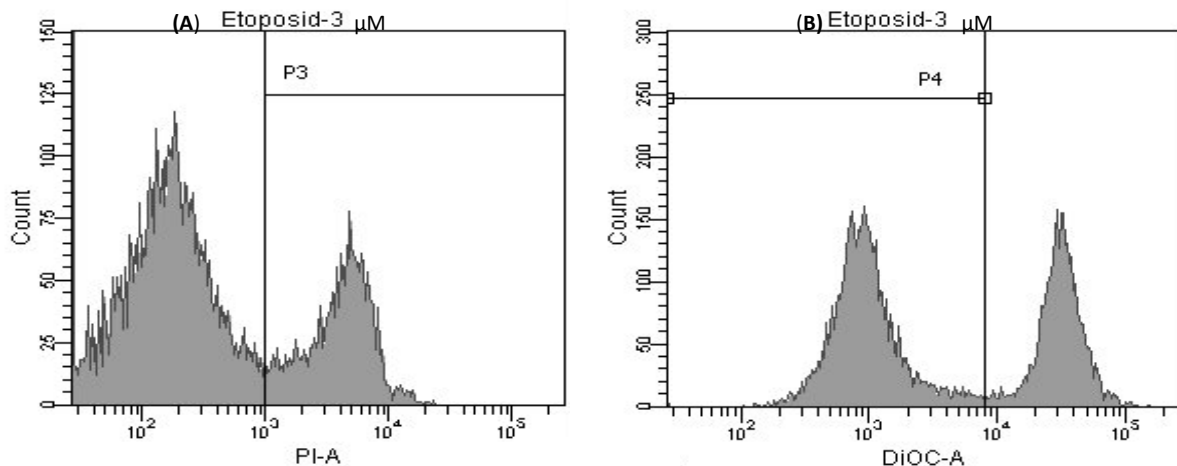


**Abb. 4: Dotplots unbehandelter CCRF-CEM (A) und Jurkat (B) mit abgegrenzter Population (P1)**

#### 3.2.4.2.1. Messung des mitochondrialen Membranpotentials

Im Rahmen der apoptotischen Signalkaskade kommt es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran. (Loeffler und Kroemer 2000) Dieses Geschehen kann durch Änderung und Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (MMP) erfasst werden. Für die Messungen wird der positiv-geladene, lipophile, grün-fluoreszierende Farbstoff DiOC<sub>6</sub>(3) (3'3-Dihexyloxacarbocyaniniodid) verwendet. Dessen Absorptionsmaximum ist 484 nm mit einem Emissionsmaximum um die 520 nm. Aufgrund seiner Lipophilität kann DiOC<sub>6</sub>(3) Zellmembranen überwinden und sich in den mitochondrialen Membranen mit intaktem, stark negativem Potential anreichern. Damit färbt das Fluorochrom nur Zellen mit intakten Mitochondrien, denn während des programmierten Zelltodes depolarisieren deren Membranen. Dadurch kann DiOC<sub>6</sub>(3) ladungsbedingt nicht in der Mitochondrienmembran zurückgehalten werden und wird bei den Waschvorgängen ausgespült. Der Anteil ungefärbter Zellen, die apoptotische Zellen mit fehlendem intaktem MMP kennzeichnen, wird in % von der Gesamtzellzahl angegeben. In dem abgegrenzten Bereich (P4) in Abb. 5-B sind Zellen ohne mitochondrial eingelagertes DiOC<sub>6</sub>(3) dargestellt.





**Abb. 5: Histogramme der Zelltodanalyse (A) und Messung des mitochondrialen Membranpotentials (B) bei CCRF-CEM**

Die Zellen wurden nach Behandlung mit 3  $\mu\text{M}$  Etoposid für 48 h inkubiert.

(A) PI wird über die permeabilisierte Zellmembran absterbender oder toter Zellen aufgenommen. Diese erscheinen im FACS als PI-positive Zellen (hier P3).

(B) Durch apoptotische Vorgänge kommt es zum MMP-Verlust. DiOC<sub>6</sub>(3) kann nicht gespeichert werden. Tote Zellen erscheinen daher DiOC<sub>6</sub>(3)-negativ (hier P4).

#### 3.2.4.2.2. Zelltodanalyse

Der für die Zelltodanalyse am häufigsten verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist Propidiumjodid (PI). Das Molekül kann nur perforierte Zellmembranen toter Zellen überwinden und interkaliert stöchiometrisch in doppelsträngige DNA (Riccardi und Nicoletti 2006). Absorptionsmaximum und Emission liegen bei 536 und 617 nm. PI-negative Zellen sind folglich vital. Beispielhaft ist in Abb. 5-A eine Region (P3) umrandet, die den prozentualen Anteil der Zellen mit erhöhter PI-Fluoreszenz repräsentiert und damit auf Zelltod hinweist.

#### 3.2.4.2.3. Kompensationsmessung

Bei der Simultanmessung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe, in dieser Arbeit PI und DiOC<sub>6</sub>(3), kann es zur Interferenz der Wellenlängenbereiche sowie zur Signaldetektion im Kanal des anderen Fluorochroms kommen. Um diese Messfehler und falsch positive Signale zu minimieren, wird eine Kompensation der Spektren am Anfang der Messreihe durchgeführt. (Jaroszeski und Radcliff 1999) Die Aussaat der Zellen, die für die Kompensation genutzt wurden, erfolgte am selben Tag wie die für die

einzelnen Versuche. Die Proben wurden eine halbe Stunde vor der Ernte mit 2 µl DiOC<sub>6</sub>(3) inkubiert. Kurz vor der Messung wurden in das dritte Kompensationsröhrchen 55 µl 0,5 %iges Triton X-100 pipettiert, welches alle Zellen abtötete. Zur Anfärbung der toten Zellen wurde 1 µl PI hinzugefügt. Um die Eigenfluoreszenz der Zellen und Medienreste auszugleichen, wurde eine Negativkontrolle ohne Farbstoffzusatz eingesetzt.

#### **3.2.4.2.4. Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen**

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 150.000 Zellen/Well in Sechs-Well-Kulturplatten ausgesät, wie unter Kapitel 3.2.2.5. beschrieben. Am nächsten Tag erfolgte die entsprechende Vorbehandlung mit GW5074 bzw. Cambinol sowie die Zytostatikabehandlung (s. Kapitel 3.2.3.). Anschließend wurden die Zellkulturen für achtundvierzig Stunden im Brutschrank bei 37°C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % sowie 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Vor der Ernte wurde jeweils 2 µl DiOC<sub>6</sub>(3) pro Well hinzupipettiert (Endkonzentration: 50 nM) und die Platten für weitere 30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit wurden das erforderliche PBS sowie Trypsin/EDTA im 37 °C Wasserbad erwärmt. Nach Mediumabnahme mittels Einwegpasteurpipette in ein 4 ml FACS-Röhrchen und einmaligem Waschen mit 500 µl PBS wurden die Zellen mit je 500 µl Trypsin/EDTA pro Well 18 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen adhärenter Zellen entfiel bei den Jurkat-Zellen. Die Platten wurden erneut mit je 1 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Zellsuspension für fünf Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Röhrchen auf Eis gehalten und das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss an die Kompensationsmessung wurden 20 sec vor der Messung zu jeder Probe 1 µl Propidiumjodid (Endkonzentration: 2 µg/ml) hinzugefügt und kurz vermischt. Die Messungen fanden am BD FACSCanto™ II statt.

#### **3.2.5. Statistische Analyse der RT-PCR-Expressionsdaten**

Für die statistischen Analysen der Sirtuin 1 - 7 Level der Patienten und KM-MNC und die Prüfung auf Signifikanz wurde die IBM-Software „SPSS Statistics 21“ verwendet. Weiterhin wurden sowohl die Expressionsdaten von p53, p21, MDM2 als auch MDM4 analysiert. Zusätzlich wurde zur Korrelation

der Expression der unterschiedlichen Sirtuinisoenzyme und zwischen SIRT-Expression und klinischen Parametern der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt.

Unter Verwendung des Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, auch als Rangsummen- oder U-Test bezeichnet, wurden anhand unabhängiger Stichproben die Signifikanzwerte von zwei bzw. mehreren unabhängigen Parametern (einerseits Sirtuinexpression in gesunden Knochenmarkspendern und Patientenproben, andererseits Sirtuinexpression und klinisch-biologische Parametern) geprüft. Die Signifikanz zwischen mehreren unabhängigen Parametern wurde mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet. Zur Reduktion der Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu begehen, wurde das Signifikanzniveau nach Holm-Bonferroni-Korrektur bestimmt.

Im Rahmen von Überlebens- und Ereigniszeitanalysen erfolgten Auswertungen mittels Kaplan-Meier Methode und Log-Rank Test. Dabei wurden das *Overall Survival* (Überleben = Diagnosedatum - *RFS* (rezidivfreies Überleben)) und die medianisierten Expressionsdaten der Sirtuine auf Signifikanz untersucht, wobei das Ereignis als Outcome (Rezidiv oder Tod) definiert war.

## **4. Ergebnisse**

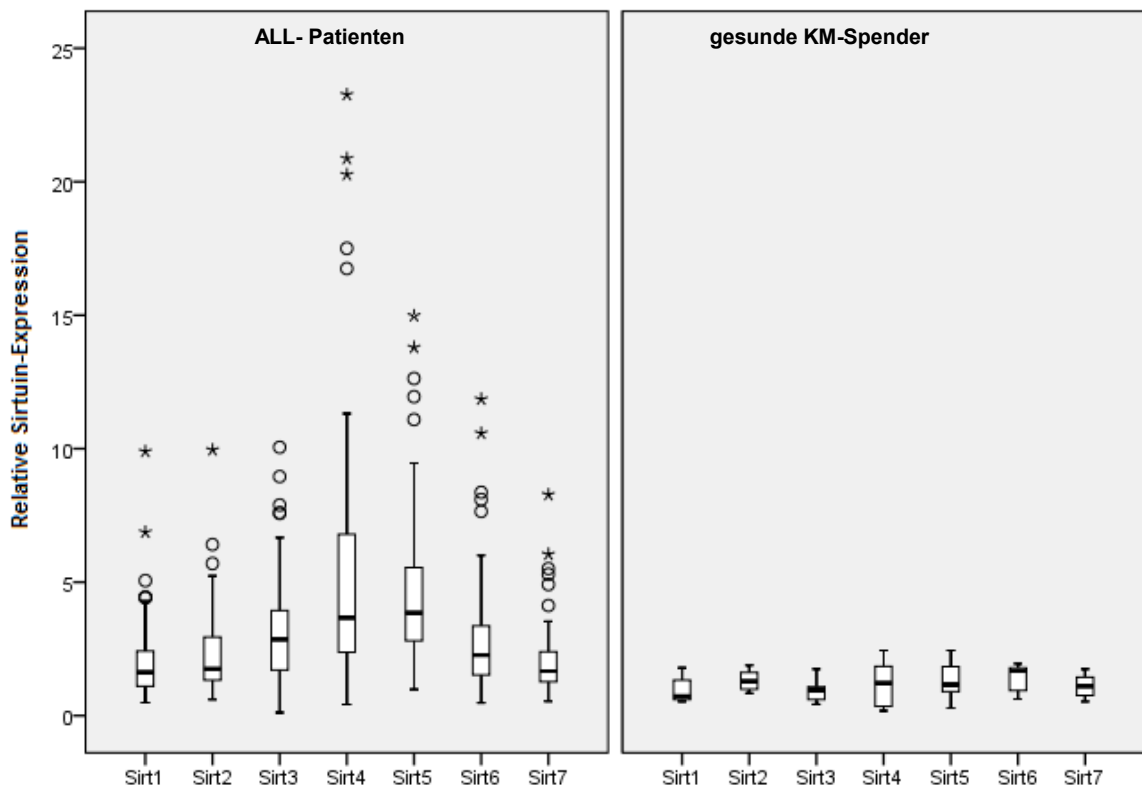
### **4.1. Sirtuinexpressionsanalyse in ALL-Patientenproben**

#### **4.1.1. Patientenproben**

In allen 89 Patienten (48 männlich, 41 weiblich) wurde zwischen 1990 und 2012 in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Jena eine initial unbehandelte ALL diagnostiziert. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren die Kinder über zwölf Monate und jünger als zwanzig Jahre. Der Median des Alters betrug sieben Jahre. Eine Ausnahme bildete ein drei Monate alter Junge mit infaustem Krankheitsverlauf. Die ALL-Diagnose wurde mittels Knochenmarkausstrich mit Pappenheim-Färbung und zytochemischen Reaktionen gestellt. Der Immunphänotyp und chromosomale Veränderungen wurden mit Standardmethoden ermittelt (Moricke et al. 2008). Die wichtigsten klinisch-pathologischen Parameter der Patienten sind in Tab. 7 (s. Anhang) zusammengefasst. Basierend auf den ALL-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM)-Kriterien wurden die Patienten in Standard-Risiko (n = 22), mittleres Risiko (n = 41) und Hoch-Risiko (n = 20) eingeteilt [6 Daten fehlend]. Die Nachbeobachtungszeit reichte von einem Monat bis 169 Monaten. Von den 89 Patienten starben zwölf Patienten in dieser Zeit, drei an der Leukämie, drei an Multiorganversagen, drei an Infektionen und drei an anderen Ursachen. Zwölf Kinder erlitten ein Rezidiv. Bei sechzehn Patienten wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Alle Patienten wurden nach multizentrischen Studien in Deutschland behandelt: ALL-BFM -90 (n = 11), ALL-BFM-95 (n = 17), ALL-BFM-99 (n = 44), ALL-BFM-2000 (n = 7), ALL-BFM-09 (n = 6), EsPhALL (n = 2), Infant99 (n = 2). Hauptsächlich kamen in den Studien Steroide (Prednison und Dexamethason), Asparaginase, Cytarabin, ein Anthracyclin, Etoposid, Methotrexat und Vincristin zur Anwendung. Das Ansprechen auf Prednison wurde anhand der Reduktion leukämischer Blasten im peripheren Blut auf weniger als 1000/ $\mu$ l am Tag acht nach siebentägiger Monotherapie mit Prednison und einer intrathekalen Methotrexatgabe am ersten Behandlungstag bestimmt. Schlechtes Ansprechen bedeutete  $\geq 1000/\mu$ l Leukämieblasten am achten Tag im peripheren Blut (Moricke et al, 2008). Von den Patienten sprachen 75 gut und 11 schlecht auf Prednison an (3 fehlende Daten).

#### 4.1.2. Sirtuinisoenzym-Expression in ALL-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern

Die quantitative Expressionsbestimmung der sieben Sirtuine in den 89 Patientenproben erfolgte auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR (s. Kapitel 3.2.1.). Als Referenz diente ein Pool aus Proben acht gesunder Knochenmarkspender. Dieser wurde gleich eins gesetzt. Es zeigte sich, dass die Expression der sieben HDAC der Klasse III in den Krebszellen im Vergleich zu den gesunden Spendern signifikant erhöht ist (s. Abb. 6). Für die einzelnen Isoenzyme bedeutet dies nach Korrektur mittels Holm-Bonferroni-Methode: SIRT1 ( $P = 0,002$ ), SIRT2 ( $P = 0,046$ ), SIRT3 ( $P < 0,001$ ), SIRT4 ( $P = 0,001$ ), SIRT5 ( $P < 0,001$ ), SIRT6 ( $P = 0,014$ ) und SIRT7 ( $P = 0,009$ ).



**Abb. 6: Sirtuinisoenzym-Expression in ALL-Patienten und gesunden Spendern**

#### 4.1.3. Korrelation der Sirtuinexpression mit klinisch-pathologischen Parametern

Die Ergebnisse der Analysen wurden auf signifikante Korrelationen mit klinischen Parametern geprüft, die zur ALL-Risikostratifizierung verwendet

werden. Dazu gehören das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, die initiale Leukozytenzahl, Immunophänotyp, Prednisonreaktion und Zytogenetik. Ein Alter von unter einem Jahr und von über zehn Jahren, Leukozytenzahl (WBC) > 50.000/ $\mu$ l, T-Zell-ALL und schlechtes Ansprechen auf Prednison sind mit einem ungünstigen Behandlungsergebnis assoziiert. Dagegen haben Patienten mit chromosomalen Veränderungen wie der *ETV6-RUNX1* t(12;21)-Translokation und Hyperdiploidie mit > 50 Chromosomen eine gute Prognose (Pui *et al*, 2008). Desweiteren wurde die Sirtuinexpression mit dem Gesamtüberleben und dem Auftreten von Rezidiven korreliert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 7 (s. Anhang) dargestellt. Die *P*-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test kalkuliert und mit der Holm-Bonferroni-Methode bei multiplen Vergleichen korrigiert.

Die Korrelation ergab, dass eine erhöhte SIRT5-Expression mit ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern assoziiert war. Hinsichtlich individueller Risikofaktoren zeigte sich eine erhöhte SIRT5-Expression in Patienten mit einem Alter über neun Jahren ( $P = 0,01$ ), einem Fehlen der *ETV6-RUNX1* t(12;21)-Translokation ( $P = 0,007$ ) und einem schlechten klinischen Ergebnis ( $P = 0,005$ ). Es konnte keine signifikante Assoziation mit Leukozytenzahl, Immunophänotyp, Prednisonreaktion oder Hyperploidie festgestellt werden. Darüber hinaus korrelierte eine erhöhte SIRT6-Expression mit einem erhöhten Patientenalter ( $P = 0,001$ ), und eine gesteigerte Expression von SIRT7 mit einer initial hohen Leukozytenzahl > 50.000/ $\mu$ l ( $P = 0,006$ ).

#### **4.1.4. Korrelationen der Expression von Sirtuinen und p53**

Mittels Spearman-Korrelation wurde einerseits getestet, inwiefern die Sirtuine untereinander korrelieren (s. Tab. 6). Dabei ergaben sich für alle *P*-Werte signifikante Ergebnisse. Das bedeutet, dass erhöhte Expression eines beliebigen Isoenzymes mit erhöhter Expression der anderen Sirtuine einhergeht. Besonders hohe Korrelationskoeffizienten (KK) ergaben sich für alle Sirtuine mit SIRT5.

Andererseits wurde die Assoziation mit p53 überprüft. Ein hohes p53 korrelierte mit einer hohen Expression von SIRT1 (KK = 0,700) sowie SIRT5 (KK = 0,694) (je  $P < 0,001$ ).

		Sirt1	Sirt2	Sirt3	Sirt4	Sirt5	Sirt6	Sirt7
p53	KK	,700*	,534*	,536*	,386*	,694*	,553*	,488*
	P-Wert	,000	,000	,000	,000	,000	,000	,000
Sirt1	KK		,522*	,596*	,519*	,774*	,469*	,556*
	P-Wert		,000	,000	,000	,000	,000	,000
Sirt2	KK			,569*	,426*	,637*	,575*	,614*
	P-Wert			,000	,000	,000	,000	,000
Sirt3	KK				,329*	,773*	,563*	,778*
	P-Wert				,002	,000	,000	,000
Sirt4	KK					,518*	,451*	,470*
	P-Wert					,000	,000	,000
Sirt5	KK						,650*	,737*
	P-Wert						,000	,000
Sirt6	KK							,711*
	P-Wert							,000

**Tab. 6: Spearman-Korrelation der Expression von Sirtuinen und p53**

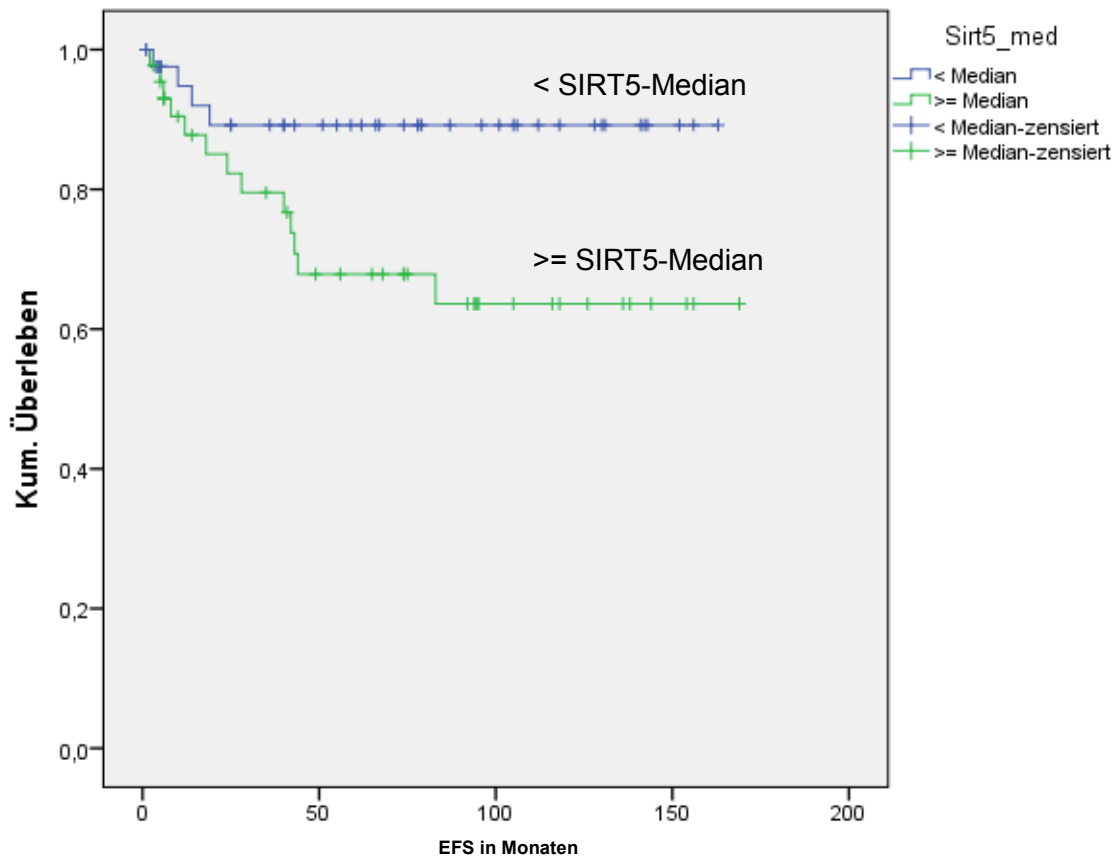
\*Die Korrelation ist auf dem 1 % Niveau signifikant (zweiseitig).

#### 4.1.5. Überlebenszeitanalysen

Häufig werden in Studien zwei Gruppen in Hinblick auf die Zeit bis zum Auftreten eines bestimmten Ereignisses bewertet. Dies wird allgemein als Überlebenszeitanalyse (*engl.: survival analysis*) bezeichnet, wobei Ereignisse positiv (z. B. Entlassung aus der Klinik), neutral oder negativ (z. B. Tod, Rezidiv) sein können. In onkologischen Studien wird die Überlebenszeit oder die Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs (*engl.: event-free survival*, EFS) unter verschiedenen Therapien oder Risikofaktoren verglichen. Dies dient unter anderem dazu, Prognosen für die erwartete Überlebenszeit eines Patienten abzugeben (Altman und Bland 1998).

In dieser Dissertation wurden die Patienten auf das Ereignis klinisches Ergebnis (Rezidiv oder Tod) (*engl.: outcome*) in Abhängigkeit von der Sirtuin-Expressionshöhe untersucht. Dazu wurden die Kaplan-Meier-Methode und der Log-Rank-Test verwendet. Es erfolgte pro SIRT eine Einteilung der Expressionsdaten in zwei Gruppen in Abhängigkeit von dem Median der einzelnen Isoenzymwerte. Die erste Gruppe bildeten die Werte unterhalb des Medians und die zweite Gruppe die Werte oberhalb des Medians. Letztere verdeutlichten damit eine gesteigerte Expression der Sirtuine. Eine erhöhte

Expression von SIRT5 war mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Rezidivs oder dem Versterben des Patienten assoziiert. Auf dem Signifikanzniveau von 5 % gab es einen statistisch signifikanten Unterschied der Überlebenskurven von Patienten mit niedriger versus hoher SIRT5-Expression ( $P = 0,029$ ). Laut Kaplan-Meier Kurve betrug die 5-Jahres-Überlebensrate bei niedriger Expression 88 % und bei hoher Expression 68 % (Abb. 7).

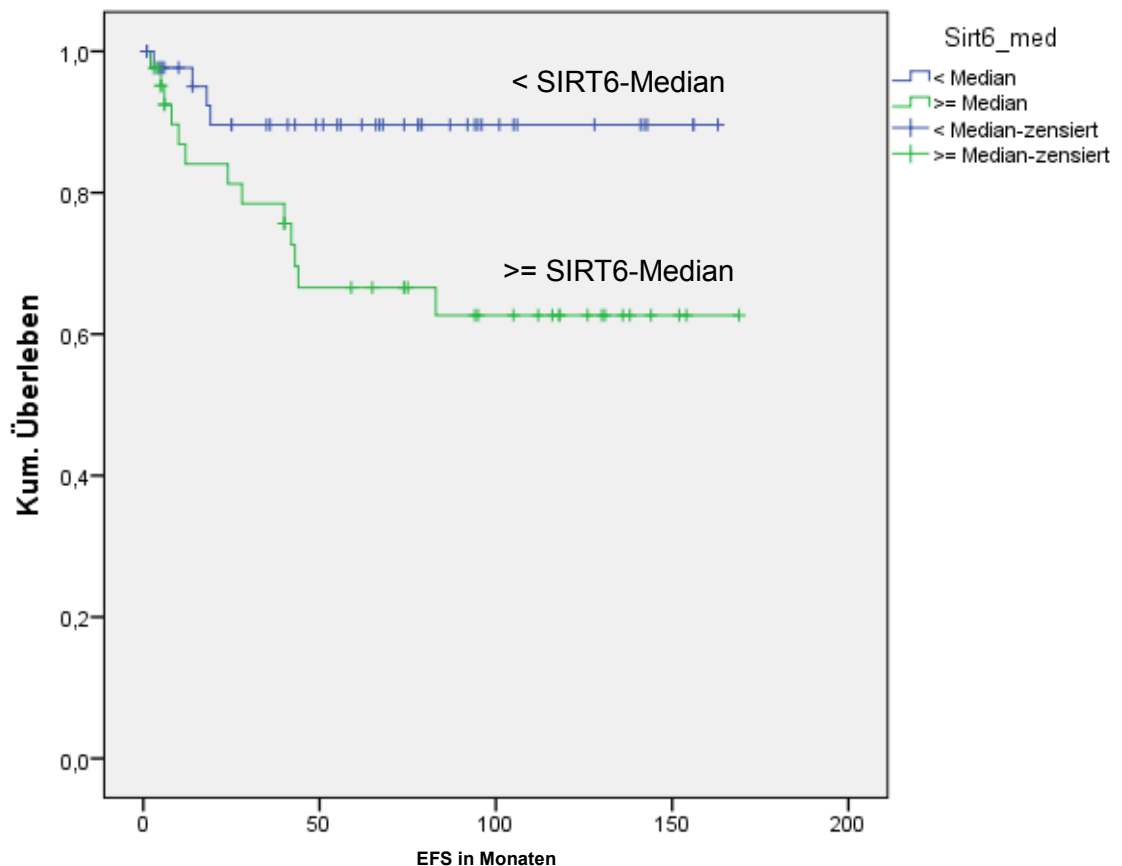


**Abb. 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für SIRT5**

Für SIRT6 zeigte sich ebenso, dass erhöhte Expressionswerte mit einem erhöhten Risiko für ein schlechtes klinisches Ergebnis einhergehen. Bei einem Signifikanzniveau von 5 % konnte ein unterschiedliches Risiko zwischen niedriger und hoher Expression statistisch signifikant nachgewiesen werden ( $P = 0,017$ ). Die Diagramme stellten dar, dass 90 % aller Patienten mit niedrigem SIRT6-Level und 66 % der Kinder mit hohem SIRT6-Level nach fünf Jahren überleben (s. Abb. 8).



Das mediane Überleben, die Zeit zu der nur noch die Hälfte der Patienten lebt, konnte für beide Kurven nicht angegeben werden, da die Kurven nicht bis 0,5 reichen. Weit über die Hälfte der Patienten überlebte in dieser Studie.



**Abb. 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für SIRT6**

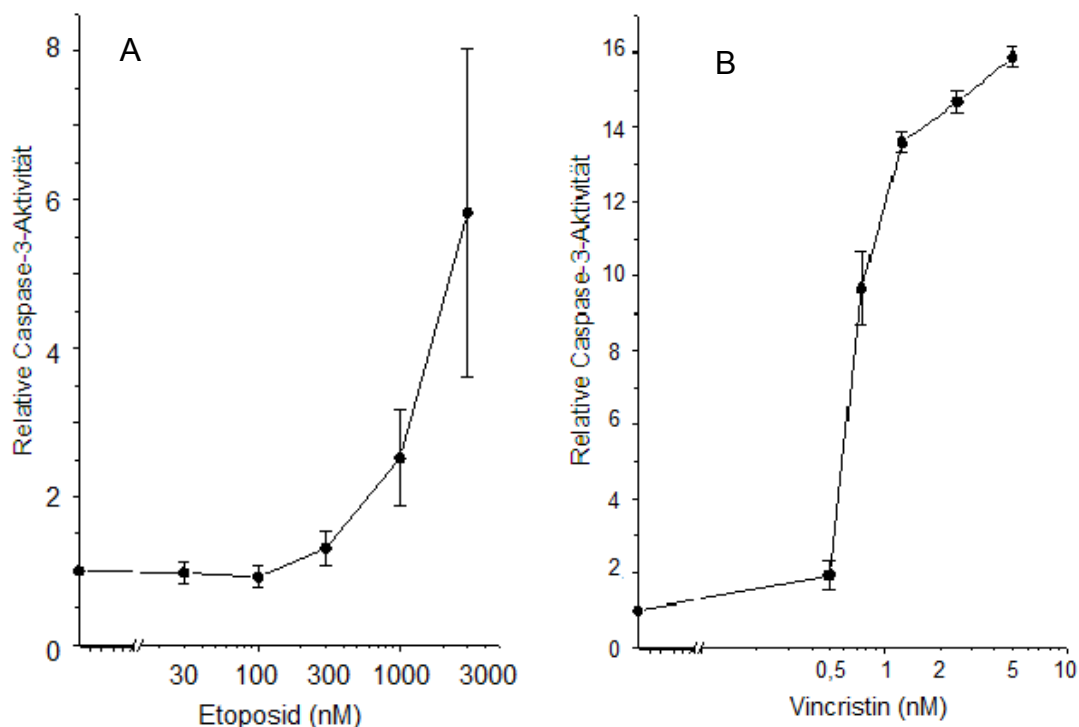
## 4.2. Zellkulturexperimente an CCRF-CEM-Zellen

Um die funktionelle Rolle eines Sirtuins in Zellkulturmodellen aufzuklären, wurden pharmakologische Inhibitionsversuche von SIRT5 in den T-Zell-ALL-Zelllinien CCRF-CEM und Jurkat durchgeführt. Die Zellen wurden mit Etoposid und Vincristin behandelt. Dies sind Zytostatika, die typischerweise in der ALL-Therapie Verwendung finden. Wir wählten SIRT5, da in den Expressionsanalysen dessen erhöhte Expression mit einem prognostisch schlechten klinischen Ergebnis assoziiert war. In Vorversuchen wurde anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven die Toxizität der Sirtuin-Inhibitoren GW5074 und Cambinol sowie von Etoposid und Vincristin überprüft. Desweiteren wurde die Kombination dieser sirtuinspezifischen Hemmstoffe auf die Wirkung der 4 h später applizierten Zytostatika untersucht.

#### 4.2.1. Vorversuche

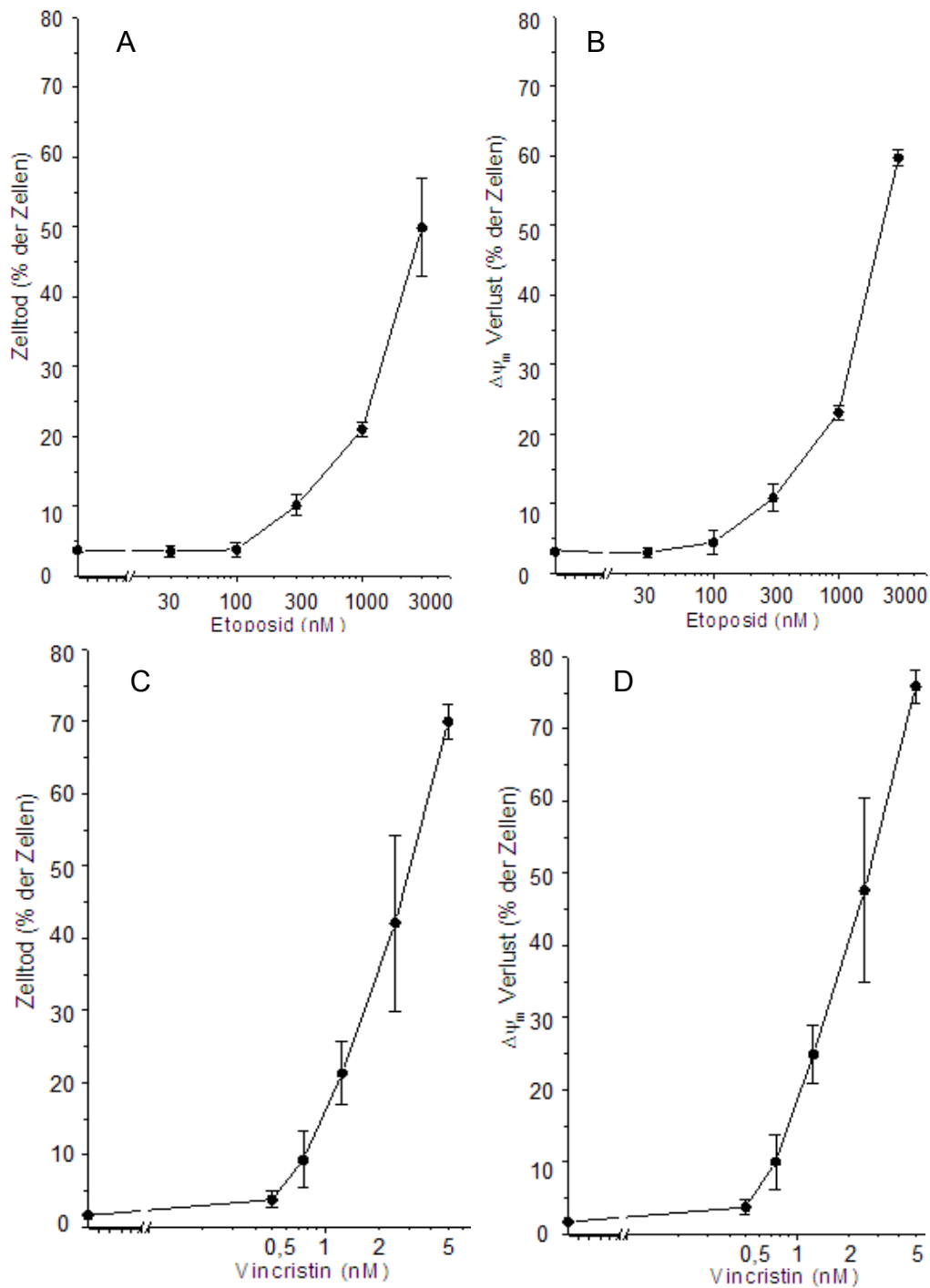
Zuerst erfolgte die Bestimmung der optimalen Dosis-Wirkungs-Beziehung für die Zytostatika Etoposid und Vincristin. Hierzu wurden die dosisabhängigen Effekte auf den Zelltod, den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi_m$ ) und die Aktivierung der Caspase 3 analysiert.

Bei Etoposid ließ sich nach 24 h ab 300 nM eine Steigerung der Caspase 3-Aktivität messen (Abb. 9 A). Auch mittels durchflusszytometrischer Analysen, die nach 48 h erfolgten, zeigte sich die konzentrationsabhängige toxische Wirkung (Abb. 10 A, B). Es ergab sich folgende Konzentrationsreihe für die Behandlungen mit Etoposid: 0; 30; 100; 300; 1000; 3000 nM. Vincristin bewirkte bereits ab 0,75 nM sowohl eine deutliche Caspase 3-Aktivierung (Abb. 9 B) als auch Effekte in den durchflusszytometrischen Analysen. In den Experimenten wurde für Vincristin die Reihe 0; 0,5; 0,75; 1,25; 2,5; 5 nM eingesetzt (Abb. 10 C, D).



**Abb. 9: Caspase 3-Aktivität in CCRF-CEM-Zellen nach Behandlungen mit Etoposid und Vincristin**

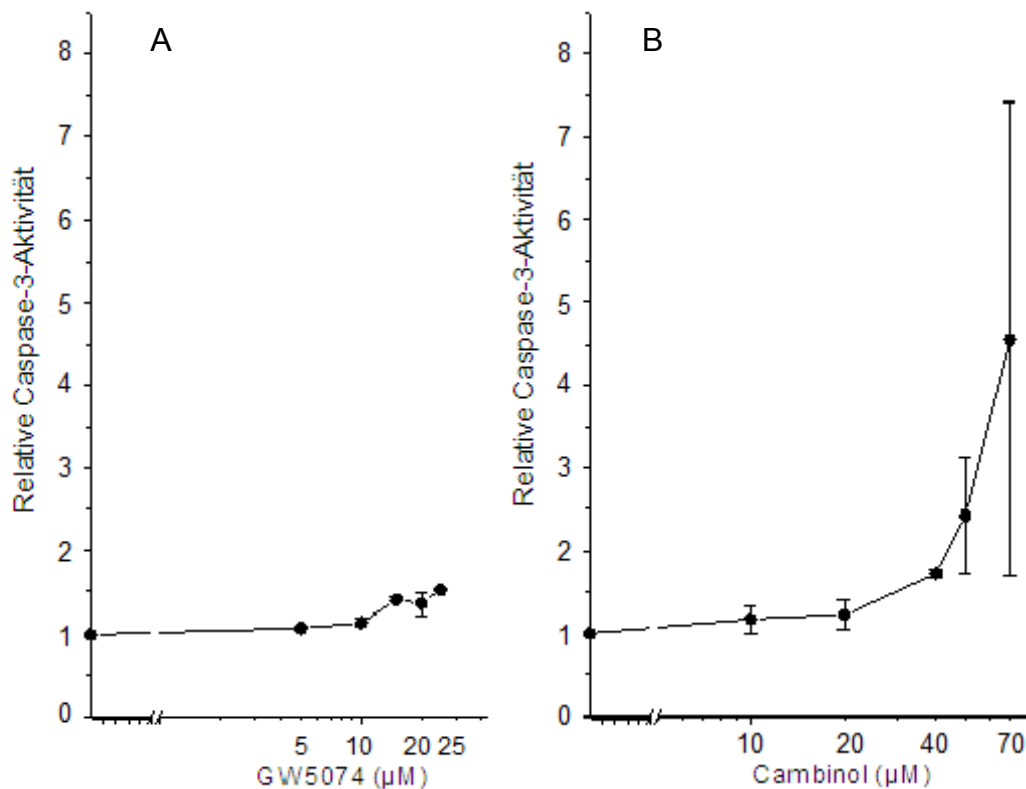
CCRF-CEM-Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von Etoposid (A) bzw. Vincristin (B) behandelt. Die detektierte Caspase 3-Aktivität wurde auf die Caspase 3-Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei Experimenten sind dargestellt.



**Abb. 10: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid- und Vincristin-Konzentrationen**

CCRF-CEM-Zellen wurden 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von Etoposid (A, B) bzw. Vincristin (C, D) behandelt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse der PI-Aufnahme (A, C).  $\Delta\Psi_m$  wurde anhand der DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung ermittelt (B, D). Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei Experimenten sind dargestellt.

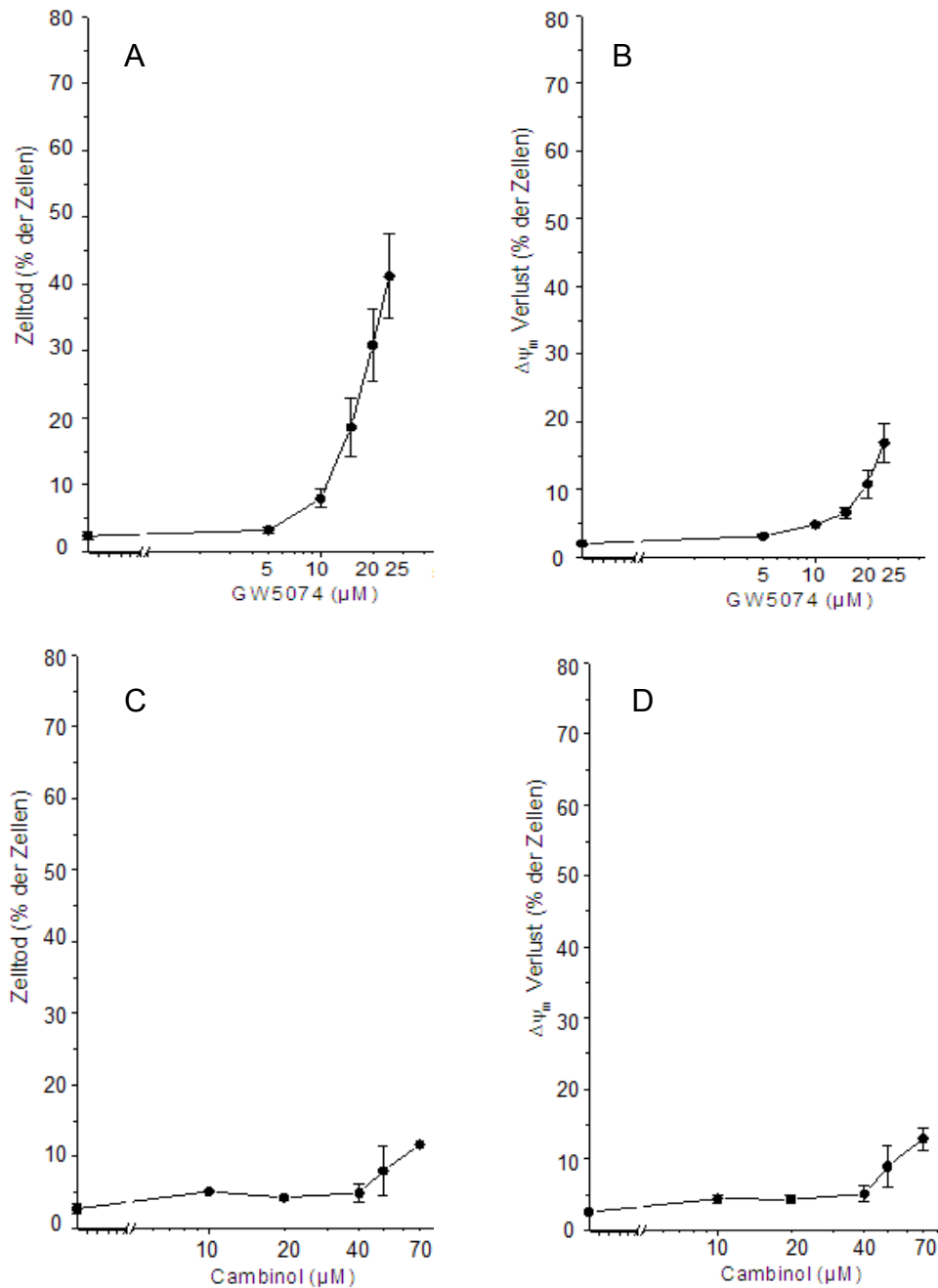
Um die optimale Konzentration für die Cambinol- bzw. GW5074-Vorbehandlung zu ermitteln, wurden Dosis-Wirkungs-Kurven dieser Sirtuin-Inhibitoren erstellt. Konzentrationsabhängig wurden die Aktivierung der Caspase 3, der Verlust des  $\Delta\Psi_m$  und der eintretende Zelltod untersucht. Abb. 11 B stellt dar, dass eine leicht erhöhte Caspase 3-Aktivität bei einer Cambinol-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  messbar war. Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten nach 48 h minimale Veränderungen ab 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 12 C, D). Für die Experimente sollte die Konzentration gerade noch nicht zytotoxisch wirken. Deshalb wurde eine Cambinol-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Die CCRF-CEM-Zellen schienen resistent gegen Cambinol zu sein, da nur mit hohen Konzentrationen ab 70  $\mu\text{M}$  eine Steigerung der Apoptose-Parameter erzielt wurde.



**Abb. 11: Caspase 3-Aktivität in CCRF-CEM-Zellen nach Behandlungen mit Cambinol und GW5074**

CCRF-CEM-Zellen wurden 24 h mit von GW5074 (A) bzw. Cambinol (B) behandelt. Die detektierte Caspase 3-Aktivität wurde auf die Caspase 3-Aktivität unbehandelter Zellen normalisiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei Experimenten sind dargestellt.

Für GW5074 ergaben sich bereits ab 15  $\mu\text{M}$  ein deutlicher  $\Delta\Psi_m$ -Verlust sowie ein Anstieg des Zelltodes (Abb. 12 A, B). Die Caspase 3-Aktivität wurde, wie in Abb. 11 A gezeigt, im getesteten Konzentrationsbereich hingegen nicht wesentlich verändert. Da eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  GW5074 in den CCRF-CEM-Zellen noch keinen verstärkten Zelltod induziert, wurde diese Konzentration im Folgenden zur Vorbehandlung eingesetzt. Zusätzlich wurden die Effekte von 15  $\mu\text{M}$  GW5074 analysiert.

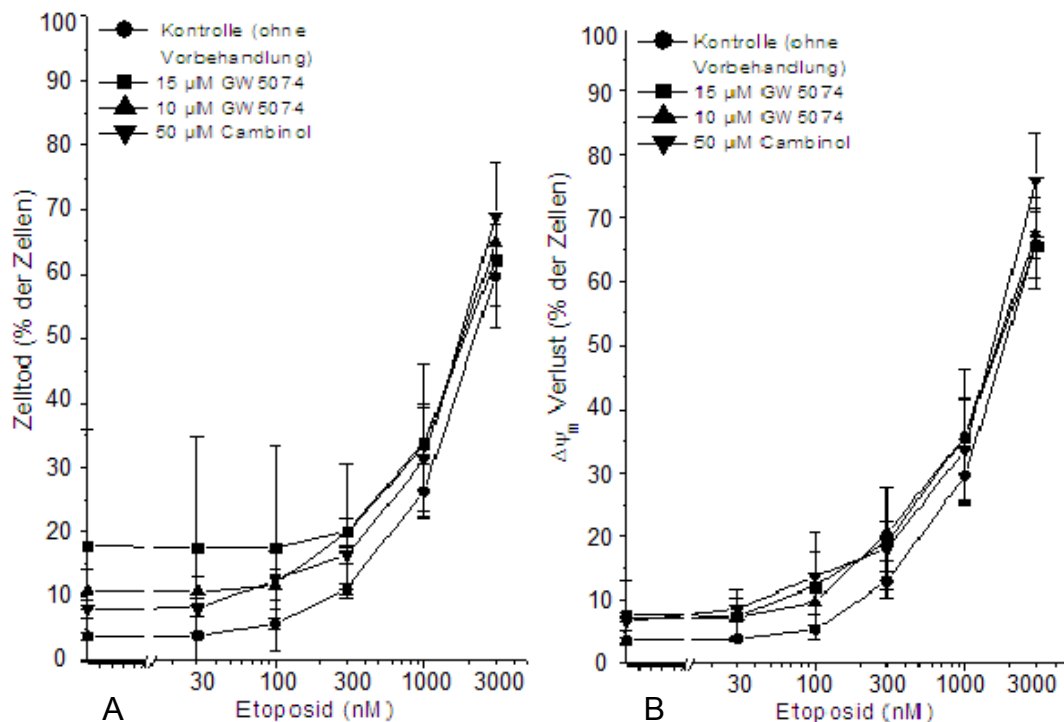


**Abb. 12: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit der Gambinol- (A, B) und GW5074-Konzentrationen (C, D)**

Mittelwerte  $\pm$  SEM aus je drei Messungen sind dargestellt.

#### 4.2.2. Wirkung von Cambinol und GW5074 auf Etoposid

Die Kombination von Cambinol bzw. GW5074 mit Etoposid (Abb. 13) führte zu keinem synergistischen Effekt. Die Wirkung von Etoposid blieb konstant. Jedoch war die Eigentoxizität in Hinblick auf den Zelltod von stärker konzentriertem GW5074 (15  $\mu\text{M}$ ) höher, sodass bereits 15 % mehr Zellen bei alleiniger Gabe dieses Sirtuin-Inhibitors starben. Bei höheren Etoposidkonzentrationen ab 300 nM glichen sich die Kurven an. Es wurde dabei keine Wirkungsveränderung durch Kombination mit Sirtuin-Inhibitoren erzielt.

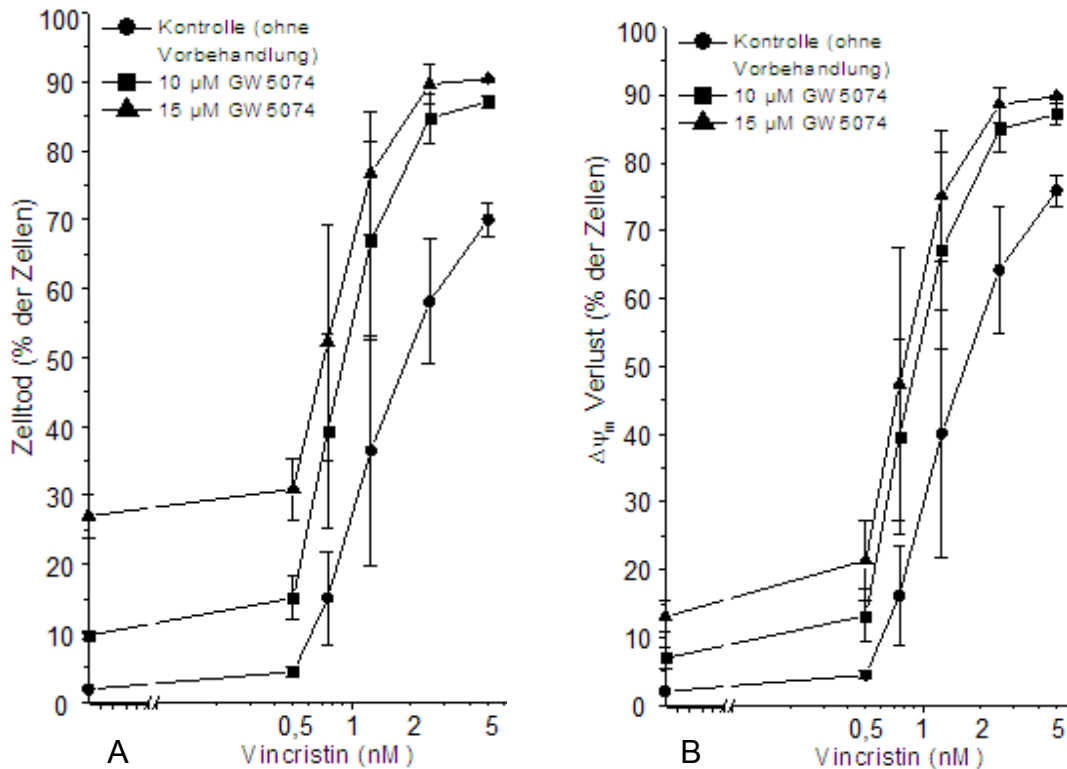


**Abb. 13: Wirkung von Cambinol und GW5074 auf den Etoposid-induzierten Zelltod (A) und Verlust des  $\Delta\psi_m$  (B) in CCRF-CEM-Zellen**

Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  SEM aus je zwei Messungen.

#### 4.2.3. Wirkung von GW5074 auf die Vincristin-Behandlung

Die Kombination von GW5074 und Vincristin wirkte synergistisch (Abb. 14). GW5074 steigerte im Vergleich zu den Kontrollzellen den Verlust des MMPs um 12 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. um 15 % (15  $\mu\text{M}$ ). Der prozentuale Zelltod erhöhte sich um 17 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. um bis zu 20 % (15  $\mu\text{M}$ ). Ein deutlicher additiver Effekt auf die Vincristin-Wirkung zeigte sich ab 0,75 nM Vincristin.



**Abb. 14: Wirkung von GW5074 auf den Vincristin-induzierten Zelltod (A) und Verlust des  $\Delta\psi_m$  (B) in CCRF-CEM-Zellen**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus je zwei Messungen.

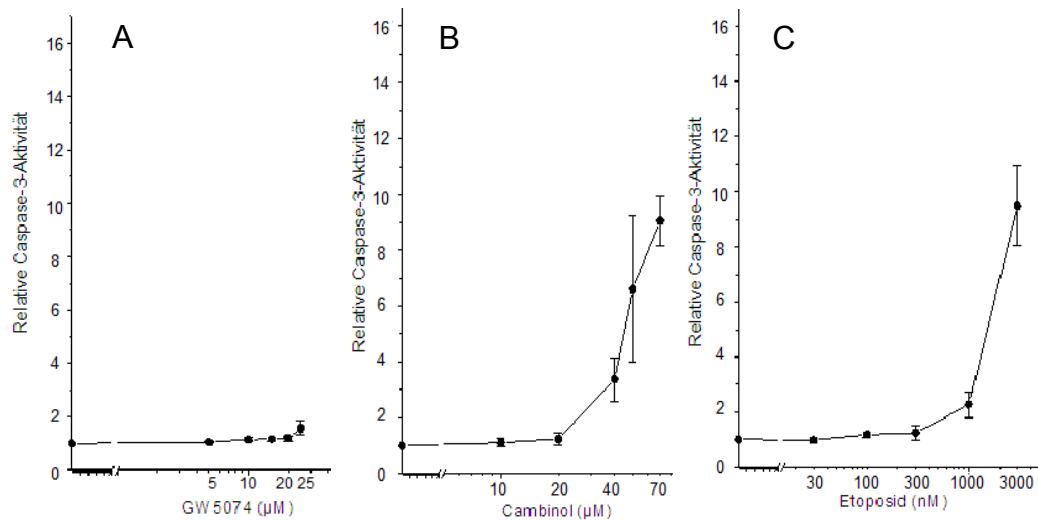
### 4.3. Jurkat-Zellen

#### 4.3.1. Vorversuche

Da die Jurkat-Zellen wesentlich empfindlicher auf Zytostatika reagieren, wurde in den Zellkulturexperimenten nur die toxische Wirkung von Etoposid untersucht. In den Dosis-Wirkungs-Analysen zeigte sich nach 24-stündiger Etoposidbehandlung ab 100 nM eine Stimulierung der Caspase-3-Aktivität (Abb. 15 C). Die konzentrationsabhängige Toxizität bestätigte sich in der Durchflusszytometrie (Abb. 16 E, F). Schlussfolgernd ergab sich für die Etoposidapplikation die Konzentrationsreihe: 0, 30, 100, 300, 1000, 3000 nM. Für die Inhibitionsversuche der Sirtuine wurden ebenso die Dosis-Wirkungs-Beziehungen für GW5074 und Cambinol auf die Caspase 3-Aktivität (Abb. 15),  $\Delta\psi_m$  und den Anteil toter Zellen (s. Abb. 16) erstellt.

Cambinol zeigte deutlich stärkere Effekte auf Jurkat-Zellen. Die Caspase 3-Aktivität wurde im Rahmen der Konzentrationsreihe auf das Achtfache (Abb. 15 B) und der prozentuale Anteil toter Zellen auf das Siebenfache

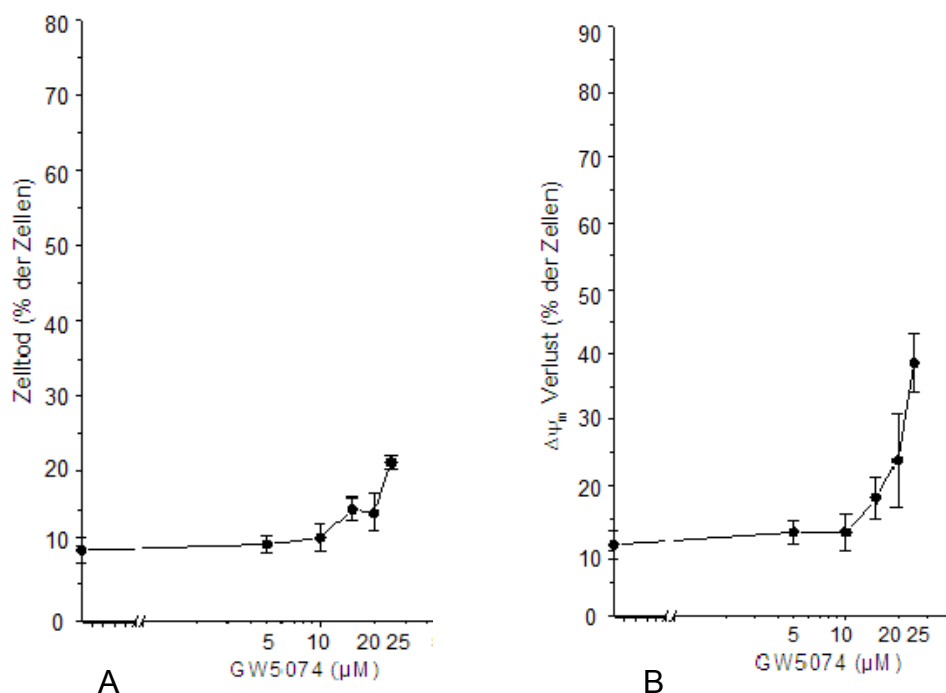
(Abb. 16 C, D) gesteigert. Hingegen sprachen die Jurkat-Zellen im Vergleich zu den CCRF-CEM-Zellen schlechter auf GW5074 an. Die Wirkung von GW5074 auf den Anteil PI-positiver Zellen und den  $\Delta\Psi_m$ -Verlust stieg ab einer Konzentration von 15  $\mu\text{M}$  an (Abb. 16 A, B). Die Aktivität der Caspase 3 blieb hingegen unabhängig von der GW5074-Konzentration nahezu konstant (Abb. 15 A). Für weitere Untersuchungen sollte die GW5074-Konzentration nicht im zytotoxischen Bereich liegen. Daher wurde für die Vorbehandlungen eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und zum Vergleich 20  $\mu\text{M}$  gewählt.



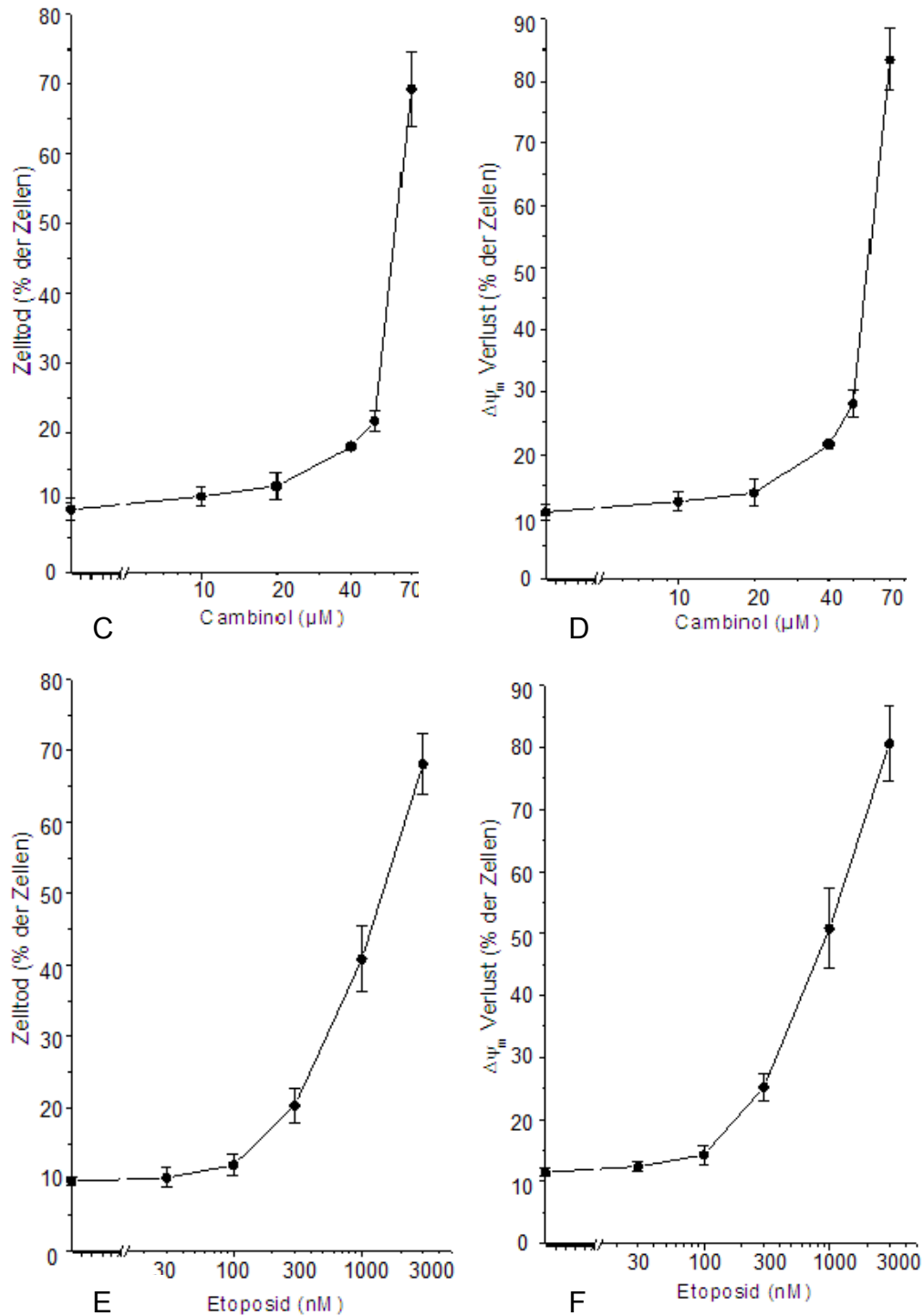
**Abb. 15: Caspase 3-Aktivität in Jurkat-Zellen**

Jurkat-Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen von GW5074 (A), Gambinol (B) und Etoposid (C) behandelt.

Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei Caspase 3-Aktivitätsmessungen sind dargestellt.





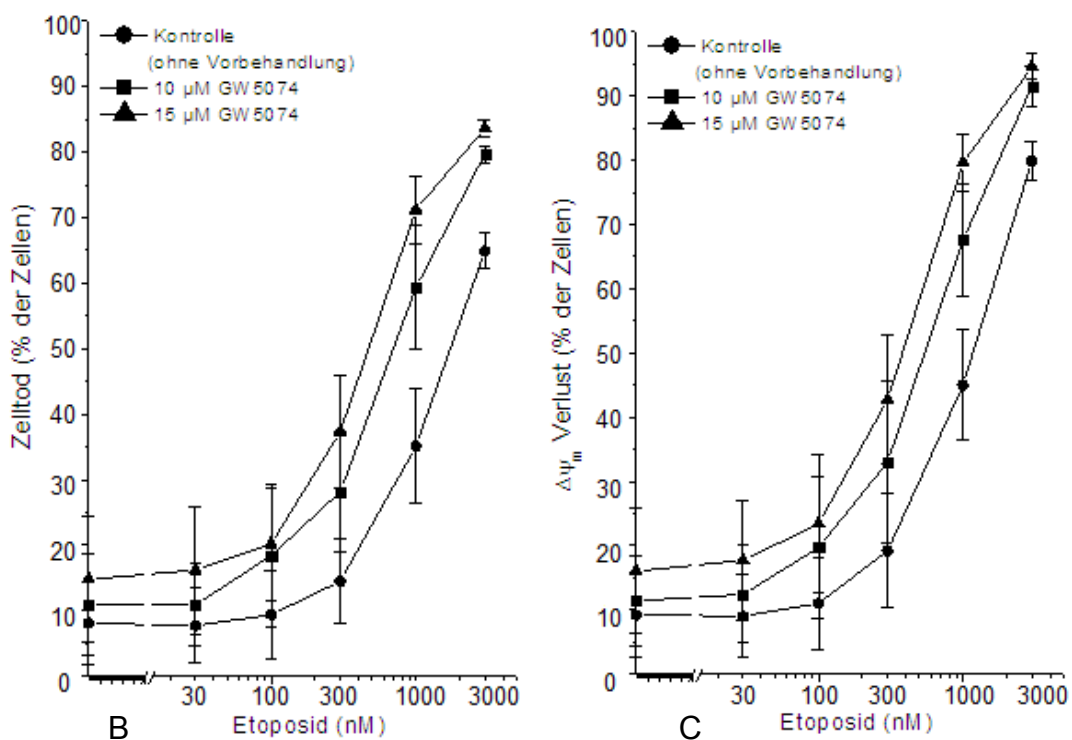
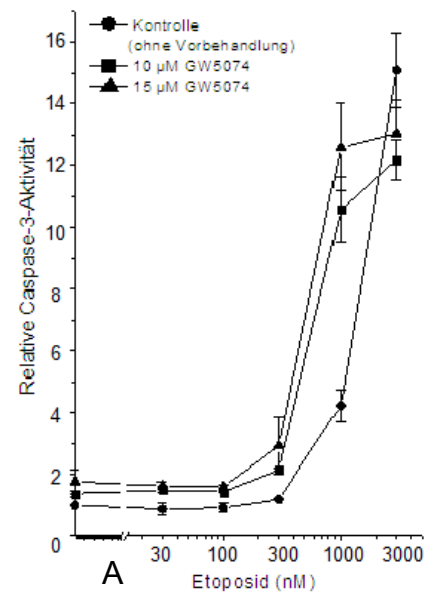


**Abb. 16: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in Jurkat-Zellen**

Jurkat-Zellen wurden 48 h mit verschiedenen Konzentrationen von GW5074 (A, B), Gambinol (C, D) und Etoposid (E, F) behandelt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils toter Zellen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analysen der PI-Aufnahme (A, D, E).  $\Delta\Psi_m$  wurde anhand der DiOC<sub>6</sub>(3)-Färbung beurteilt (B, C, F). Mittelwerte  $\pm$  SEM von je drei Experimenten sind dargestellt.

#### 4.3.2. Wirkung von GW5074 auf die Etoposid-Behandlung

Die Vorbehandlung mit GW5074 führte in den Jurkat-Zellen zu einer deutlichen Verstärkung der Etoposid-induzierten Caspase 3-Aktivität (Abb. 17 A). Durch 10  $\mu\text{M}$  GW5074 ließ sich eine Aktivitätszunahme von 60 % darstellen. 15  $\mu\text{M}$  verdreifachten die Etoposidwirkung. Die Verstärkung erreichte allerdings bei einer Konzentration von 1 mM Etoposid ihr Maximum. Dann flachte die Wirkung des Sirtuin-Inhibitors hin zu einer Sättigungskurve ab. Nach 48 h war dieser Effekt auch im Anteil toter Zellen (Abb. 17 B) und im Verlust des  $\Delta\Psi_m$  (Abb. 17 C) erkennbar. Die Wirkung von Etoposid wurde dabei durch 10  $\mu\text{M}$  GW5074 um bis zu 25 % und durch 15  $\mu\text{M}$  um bis zu 35 % verstärkt. Da jedoch auch offensichtliche Abweichungen (SEM) vorhanden waren, wirkt sich der Effekt in den funktionellen Tests moderat additiv auf die Zytotoxizität von Etoposid.

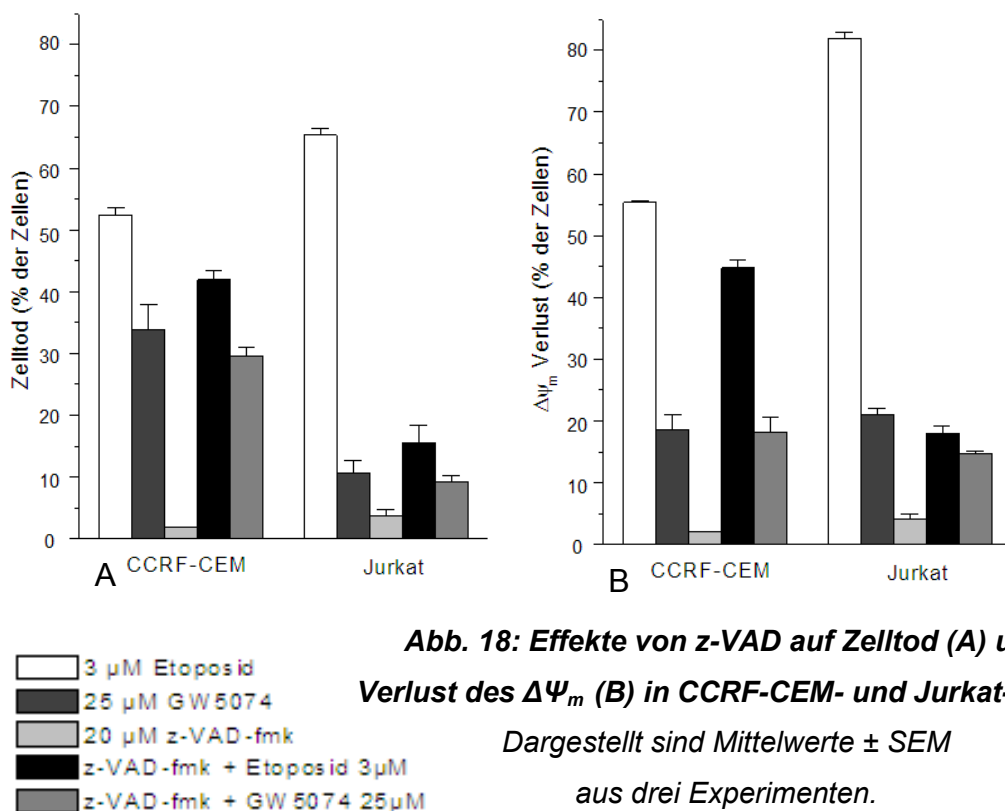


**Abb. 17: Wirkung von GW5074 auf den Etoposid-induzierten Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  sowie die Caspase-3-Aktivität in Jurkat-Zellen**  
Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von jeweils zwei Experimenten.

#### 4.4. z-VAD-Experimente

Mittels des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD sollte analysiert werden, welchen Zelltodmechanismus GW5074 in den CCRF-CEM- bzw. in den Jurkat-Zellen induziert. Die Zellviabilität wurde in durchflusszytometrischen Tests ermittelt. In den Caspase-3-Assays kam es durch GW5074-Applikation zu keiner Aktivitätsänderung des Enzyms. In der Durchflusszytometrie wurden jedoch deutliche Wirkungen auf Zelltod und MMP dargestellt. Diese Effekte sollten durch einstündige Vorbehandlung mit z-VAD näher untersucht werden.

Als Kontrolle diente Etoposid, das einen Caspase-abhängigen Zelltod auslöst. In den Jurkat-Zellen reduzierte z-VAD im Vergleich zu den Etoposid-Kontrollzellen den prozentualen Zelltod signifikant um 50 % (Abb. 18 A) sowie den Verlust des MMPs um 60 % (Abb. 18 B). Bei den CCRF-CEM-Zellen konnte in beiden funktionellen Analysen nur eine leichte Abschwächung der Etoposidwirkung um 10 % erzielt werden. Folglich zeigt z-VAD zelllinienabhängige Unterschiede in der Beeinflussung des Zelltodes. Z-VAD an sich wirkte minimal zytotoxisch. GW5074 wurde durch z-VAD-Vorbehandlung in seiner zelltodinduzierenden Wirkung sehr wenig abgeschwächt. Der Effekt ist gering, sodass man auf einen Caspase-unabhängigen Zelltodmechanismus durch Inhibition von SIRT5 schließen kann.



## 5. Diskussion

Die Sirtuine gelten als vielversprechende Angriffspunkte in der Therapie verschiedener Krebsarten und anderer Erkrankungen. Von den sieben Sirtuinen wurde mit Ausnahme von SIRT5 berichtet, in die Tumorgenese involviert zu sein. Abhängig vom zellulären und molekularen Kontext weisen die SIRTs sowohl tumorsuppressive als auch -fördernde Funktionen auf (Roth und Chen 2013).

Die Intention dieser Doktorarbeit war die Bestimmung der Expression der sieben Sirtuinisoenzyme in pädiatrischer akuter lymphoblastischer ALL sowie die Untersuchung der Wirkung spezifischer Sirtuininhibitoren auf die Zytotoxizität von Vincristin und Etoposid in kindlichen Leukämiezellen.

### 5.1. Genexpressionsanalyse - SIRT5 als therapeutischer Angriffspunkt und prognostischer Marker in pädiatrischer ALL

In dieser Dissertation wurde die Genexpression der sieben SIRT-Isoformen in kindlichen ALL-Proben untersucht. Zuerst wurden diese Daten mit dem SIRT-Expressionslevel von MNC gesunder Knochenmarkspender und klinisch-pathologischen Parametern verglichen. Als zweites erfolgte die Korrelation mit relevanten klinisch-pathologischen Parametern.

Signifikant zeigte sich eine generell erhöhte Expression aller Histon-deacetylasen der Klasse III in Patienten im Verhältnis zu gesunden Spendern. Dies stimmt mit unserer vorhergehenden Studie überein, die eine gesteigerte HDAC-Aktivität in kindlichen Leukämiezellen demonstrierte (Sonnemann et al. 2012). Folglich deuten diese Ergebnisse an, dass erhöhte HDAC- bzw. SIRT-Aktivität das Resultat erhöhter Genexpression sind und, vice versa, erhöhte SIRT-Genexpression in gesteigerte Aktivität dieser Enzyme umgesetzt wird. Die erhöhte HDAC-Aktivität bewirkt eine verminderte Histon- und Nichthiston-Acetylierung. In erwachsenen ALL-Patienten ist die niedrige Histonacetylierung mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Advani et al. 2011). Aufgrund dieser Daten scheint der Einsatz von HDACi und Sirtuin-Inhibitoren in der Behandlung der ALL vielversprechend zu sein.

Zusätzlich wurde in den Überlebenszeitanalysen für die Sirtuine 5 und 6 dargestellt, dass eine erhöhte Expression dieser Enzyme mit einer

geringeren Überlebenszeit der Patienten einhergeht. Dies wurde in Hinblick auf das Ereignis „klinisches Ergebnis“ (Rezidiv oder Tod) nachgewiesen. Hohe Expressionen von SIRT5 und SIRT6 waren signifikant mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten eines Rezidivs oder dem Versterben der Patienten assoziiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate niedriger Sirtuin5/6-Expression lag deutlich über der 5-Jahres-Überlebensrate hoher Expression. Diese Ergebnisse sind unter Vorbehalt zu sehen, da es in dieser Studie viele zensierte Ereignisse gab. Die meisten Patienten hatten nur einen kurzen Beobachtungszeitraum, in dem die Ereignisse Rezidiv oder Tod nicht auftraten (*engl: loss to follow up*). Auch die Länge der Beobachtungszeit und die Risikofaktoren schwankten von Patient zu Patient. Unsicher ist daher, ob die Prognosen über die Zeit konstant bleiben werden und ob Sirtuin-Level für pädiatrische ALL tatsächlich als prognostische Marker herangezogen werden können. Umfangreichere Studien sind notwendig, in die weitere Risikokonstellationen einbezogen werden müssten. Dazu sollte die Länge des Beobachtungszeitraumes erhöht und vergleichbarer werden.

Die Korrelation der Sirtuin-Daten mit relevanten klinisch-pathologischen Parametern führte zu folgenden Erkenntnissen. Die erhöhte Expression dreier Sirtuine ging signifikant mit prognostisch ungünstigen Faktoren einher: gesteigertes SIRT6 war mit einem erhöhten Patientenalter ( $P = 0,001$ ) und hohes SIRT7 mit einer initial hohen Leukozytenzahl  $> 50.000/\mu\text{l}$  ( $P = 0,006$ ) assoziiert. Das Sirtuinisoenzym, dessen hohe Expression mit der größten Anzahl an Risikofaktoren korrelierte, war SIRT5. Es zeigte in Patienten mit einem Alter über neun Jahren, bei einem Fehlen der protektiven ETV6-RUNX1 t(12;21)-Translokation und, was am wichtigsten ist, bei einem schlechten klinischen Ergebnis in Form von Tod oder Rezidiv gesteigerte Expressionslevel.

SIRT5 ist das Sirtuin, über das am wenigsten bekannt ist. Studien, die die Gewebeverteilung von SIRT5 analysierten, fanden erhöhte Expressionen in Gehirn, Herz, Leber, Niere, Muskulatur und Hoden (Lymphoblasten wurden dabei nicht getestet). Diese Ergebnisse führen zu der Spekulation, dass SIRT5 generelle Funktionen erfüllt, die in allen Geweben gebraucht werden (Gertz und Steegborn 2010). SIRT5 besitzt sowohl eine entscheidende Rolle in der Regulation metabolischer Prozesse als auch bei der zellulären

Apoptose. Liu et al. wiesen in einer Untersuchung an Ratten nach, dass das mitochondriale Protein Kardiomyozyten gegen Apoptose schützt, die durch oxidativen Stress induziert wird (Liu et al. 2013a).

Das Isoenzym katalysiert neben der Deacetylierung die Abspaltung von Malonyl- und Succinyl-Gruppen von Ziellysinen, d. h. eine Deacylierung (Du et al. 2011). Dabei ist das modifizierte Substratspektrum weitestgehend unbekannt. Vorwiegend werden Enzyme des mitochondrialen Stoffwechsels beeinflusst, die in dem Citratzyklus, Aminosäureabbau, Fettsäuremetabolismus sowie Harnstoff-Zyklus und Purinstoffwechsel agieren. Hauptsubstrate von SIRT5 sind PDH, SDH, CPS1 und Uricase. Über die kleine extramitochondriale SIRT5-Fraktion ist nichts bekannt. (Park et al. 2013, Nakagawa et al. 2009). Deacetylierung der CPS aktiviert das Enzym. Dies fördert die Harnstoffproduktion und die Ausscheidung überschüssigen Ammoniaks. Obwohl die Succinylierung die Aktivität der CPS1 und der Isozitatdehydrogenase reguliert, ist bis jetzt nicht geklärt, wie die epigenetischen Modifikationen zelluläre Funktionen verändert. (Park et al. 2013). Dysregulierte SDH fördert die Anreicherung von Succinat und mitochondrialen ROS, die HIF1 $\alpha$  und Angiogenese aktivieren (Selak et al. 2005). Dadurch könnte SIRT5 Einfluss auf die Entstehung von Neoplasien haben. Das SIRT5-Gen befindet sich auf dem Chromosomen-Lokus 6p23, der zu einer Vielzahl chromosomaler Aberrationen führt, die mit malignen Krankheiten assoziiert sind (Mahlknecht et al. 2006). Interessanterweise enthalten die SIRT5-Introns 1, 2, 5 und 7 multiple repetitive Sequenzen, welche das Gen für Chromosomenbrüche anfällig machen. Zusätzlich deuten die Analysen von Mahlknecht et al. an, dass SIRT5 neben Herzzellen und Thymus vorwiegend in Lymphoblasten exprimiert wird. Dies führt zu der Hypothese, dass Chromosomenbrüche in SIRT5 möglicherweise zu Leukämien führen (Mahlknecht et al. 2006). Bis jetzt gab es keinen Beweis für die Beteiligung dieses mitochondrialen Enzyms an der Tumorgenese. Des Weiteren ist nichts über dessen Funktionen in Zelltodmechanismen bekannt. Aufgaben in der Apoptoseregulation sind spekulativ. In einer Arbeit wurde für hoch exprimiertes SIRT5 eine proapoptotische Funktion in Kleinhirnneuronen beobachtet (Pfister et al. 2008). Die SIRT5-abhängige Deacetylierung von Cytochrom c führt möglicherweise zu dieser Aktivität.

Auch das wenig verstandene, komplexe Zusammenspiel der verschiedenen mitochondrialen Sirtuine (3, 4, 5) und der posttranslationalen Modifikationen an Histonen und Signal-Proteinen zum Beispiel an p53 wurde beschrieben (Rardin et al. 2013).

Im Gegensatz zu den genannten Studien, die SIRT5 lediglich als Regulator im zellulären Metabolismus beschreiben, weist diese Arbeit als erste auf eine mögliche Funktion dieses Proteins in der Entstehung einer Krebserkrankung, der kindlichen akuten lymphoblastischen Leukämie. Damit ist SIRT5 potentiell ein geeigneter neuer krebstherapeutischer Angriffspunkt. Die Vorteile einer zielgerichteten Behandlung sind neben den geringeren Nebenwirkungen eine mögliche Verbesserung der Lebensqualität und des ereignisfreien Überlebens (EFS).

Diese Ergebnisse könnten SIRT5 als neuen prognostischen Marker in kindlicher ALL definieren. Je höher die mRNA-Expression von SIRT5, desto größer die Wahrscheinlichkeit, einen ungünstigen Krankheitsverlauf zu haben. Es fanden sich jedoch keine signifikanten Assoziationen mit weiteren typischen Parametern, die zur ALL-Risikostratifizierung genutzt werden, wie Leukozytenzahl, Immunophänotyp, Prednisonreaktion oder Hyperploidie, was die prognostische Aussagefähigkeit einer erhöhten SIRT5-Expression einschränkt.

Zusätzlich ist der Umfang dieser Arbeit mit 89 Patienten nicht sehr groß und es zeigten erfreulicherweise nur achtzehn Kinder ein schlechtes klinisches Ergebnis, im Sinne von Rezidiv oder Tod, was die Generalisierbarkeit der Daten ebenfalls begrenzt.

### **5.2. Korrelationen der Expression von Sirtuinen und p53**

Die Spearman-Korrelationen zeigten, dass die erhöhte Expression eines beliebigen Sirtuins mit der gesteigerten Expression der anderen Isoenzyme zusammenhängt. Dabei ergaben sich besonders bei SIRT5 hohe Korrelationskoeffizienten (KK) mit den übrigen Sirtuinen. Dies lässt schlussfolgern, dass SIRT5 als ein Marker für die Expression der anderen Sirtuine genutzt werden könnte.

Darüber hinaus konnte in der Assoziation zwischen Sirtuinen und p53 dargestellt werden, dass hohe p53-Werte mit erhöhten Expressionen von SIRT1 sowie SIRT5 einhergehen.

Als Antwort auf Onkogen-Aktivierung oder DNA-Schädigung hemmt p53 das Zellwachstum durch Induktion der Apoptose oder Zellzyklusarrest. Das wohl wichtigste Tumorsuppressor-Protein ist in über 50 % menschlicher Tumoren mutiert und somit inaktiv (Liu et al. 2013b). Das Netzwerk der p53-Signaltransduktion ist umfassend und noch nicht bis ins Detail verstanden.

Eine Studie stellte dar, dass SIRT1 p53 bei Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies deacetyliert und dadurch dessen Translokation in den Zellkern unterbindet. Die zytosolische und mitochondriale Akkumulation bewirkt eine Transkriptions-unabhängige Apoptose durch p53 (Bosch-Presegue und Vaquero 2011). Andererseits ist über die Regulation von p19ARF eine p53-Aktivierung möglich. Weiterhin konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass Sirtuin-Überexpression nicht vor dem Zelltod schützt. Entscheidend ist hierbei der Deacetylierungsstatus von Nicht-Histonproteinen auf epigenetischer Ebene (Bosch-Presegue und Vaquero 2011). Diese Fakten verdeutlichen, dass Genexpression nicht allein ausschlaggebend für Apoptoseinduktion ist, sondern die Aktivität der Proteine vor allem posttranskriptionalen Modifikationen unterliegt.

Eine molekular begründete Erklärung für die Korrelation der erhöhten SIRT1-Expression mit einem hohen p53 erschließt sich aufgrund anderer Studien nicht. Außerdem kann das klinische Ergebnis antineoplastischer Therapien von dem p53-Status der Tumorzellen abhängen. Sonnemann et al. untersuchten Krebszellen mit unterschiedlichem p53-Status. Sie evaluierten, dass HDACi die Expression von p53 erhöhen und der Sirtuin-Inhibitor Tenovin-1 einen p53-abhängigen Zelltod herbeiführt (Sonnemann et al. 2013). Umso wichtiger erscheint es, Therapien zu entwickeln, die nicht von einem funktionsfähigen p53 abhängen. Es lohnt sich also, die komplexe Rolle von p53 in Hinblick auf dessen Interaktion mit den Sirtuinen weiter zu untersuchen.

Schließlich lässt sich die Korrelationen der Expressionen von Sirtuinen und p53 auch damit erklären, dass letzteres ein Transkriptionsstimulator für die Sirtuine sein könnte (Shang et al. 2009).



### 5.3. Monotherapie mit Sirtuin-Inhibitoren

Da im ersten Teil der Doktorarbeit eine SIRT5-Überexpression in den Leukämiezellen gefunden wurde, erschien der Einsatz eines spezifischen SIRT5-Hemmers, GW5074 (Suenkel et al. 2013), in den folgenden in vitro-Versuchen als sinnvoll. Zum Vergleich wurde das SIRT1 und SIRT2-hemmende Cambinol (Medda et al. 2009) eingesetzt. Die Bestimmung der Zytotoxizität und Apoptoseinduktion erfolgte mittels Messung des Anteils toter Zellen, des Verlusts von  $\Delta\Psi_m$  und der Caspase 3-Aktivität.

Darstellen ließ sich eine signifikante Steigerung des Zelltodes durch GW5074-Monotherapie sowohl in CCRF-CEM- (vierzigfacher Anstieg) als auch in Jurkat-Zellen (zehnfache Steigerung). Tendenziell steigerte GW5074 den  $\Delta\Psi_m$ -Verlust. Dabei waren die MMPs-Analysen schwierig auswertbar, da GW5074 als gelbe Substanz mit der gelben DiOC6(3)-Färbung interferierte.

Unklar ist auch, wie dieser Effekt auf die Apoptose molekularbiologisch zustande kam. GW5074 hemmt die Deacetylase-Funktion von SIRT5 nur geringfügig, die Desuccinylase-Aktivität indes sehr deutlich (Suenkel et al. 2013). Es ist also denkbar, dass nicht die erhöhte Acetylierung, sondern die erhöhte Succinylierung für den beobachteten Effekt verantwortlich ist. Jedenfalls ist GW5074 einer der ersten SIRT5-Inhibitoren und damit eine interessante Substanz am Anfang der Entwicklung SIRT5-spezifischer Hemmstoffe. Diese Studie deutet auf einen potentiellen Einsatz des Sirtuin-Inhibitors sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Zytostatika hin.

In beiden Zelllinien konnte jedoch keine Zunahme der Caspase-3-Aktivität registriert werden. Es lässt sich spekulieren, dass GW5074 einen Zelltod induziert, der die Caspase 3 nicht aktiviert. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Caspase 3-Aktivität zu einem späteren Zeitpunkt detektierbar gewesen wäre. Um einen nicht apoptotischen Zelltodweg zu bestätigen, wurden Experimente mit z-VAD-fmk, einem Pancaspase-Inhibitor durchgeführt. Der GW5074-vermittelte Zelltod konnte sowohl in CCRF-CEM- als auch in Jurkat-Zellen nur sehr marginal reduziert werden. Das Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass SIRT5 in Krebszellen an der Verhinderung anderer Zelltodmechanismen als der Apoptose beteiligt

ist, weil GW5074 einen Caspase-unabhängigen Zelltod auslöst. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe mit dem Sirtuin-Inhibitor Tenovin-1 haben in anderen Zellreihen gezeigt, dass dieser Wirkstoff in einigen Zelllinien ebenso zu einem Caspase-unabhängigen Zelltod führt (Persönliche Mitteilung durch Dr. Sonnemann, Manuskripte in Vorbereitung).

Cambinol führte in den CCRF-CEM-Zellen zu keiner relevanten Steigerung von Caspase-3-Aktivität, Zelltod und MMP-Verlust. In den sensibleren Jurkat-Zellen hingegen kam es ab 70  $\mu\text{M}$  zu einer deutlichen Steigerung von Zelltod und MMP-Verlust. Dies könnte jedoch ein unspezifischer Effekt sein. Es ist ungewiss, ob die Effekte nur durch die Sirtuininhibition ausgelöst wurden oder durch die Toxizität von hochdosiertem Cambinol und dem Lösungsmittel DMSO an sich.

#### **5.4. Wirkung von Sirtuin-Inhibitoren auf Zytostatikatoxizität**

In den resistenten CCRF-CEM-Zellen führte die Kombination von GW5074 bzw. Cambinol mit Etoposid zu keinem synergistischen Effekt. Die Wirkung von Etoposid blieb konstant, sodass keine Wirkungsveränderung des Zytostatikums durch Kombination mit Sirtuin-Inhibitoren erzielt wurde.

GW5074 wirkte additiv auf Vincristin ab einer Konzentration des Zytostatikums von 0,75 nM. Es steigerte den Verlust des MMPs um 12 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. um 15 % (15  $\mu\text{M}$ ). Der prozentuale Zelltod erhöhte sich um 17 % (10  $\mu\text{M}$ ) bzw. um bis zu 20 % (15  $\mu\text{M}$ ).

Eine Vorbehandlung mit GW5074 bewirkte in den Jurkat-Zellen die deutliche Steigerung Etoposid-induzierter Caspase 3-Aktivität. Auch in den durchflusszytometrischen Analysen ließ sich dieser synergistische Effekt bestätigen. Sowohl Zelltod als auch MMP-Verlust ließen sich durch 10  $\mu\text{M}$  GW5074 um bis zu 25 % und durch 15  $\mu\text{M}$  um bis zu 35 % verstärken. Da jedoch auch offensichtliche Abweichungen (SEM) vorhanden waren, wirkt sich der Effekt in den funktionellen Tests moderat additiv auf die Zytotoxizität von Etoposid.

Aus den Zellkulturexperimenten lässt sich schlussfolgern, dass eine Kombination von 15  $\mu\text{M}$  GW5074 und Etoposid oder Vincristin effektiv erscheint, um eine gute Wirkung zur ALL-Behandlung zu entfalten.

Angesichts der fehlenden Wirkung beim alleinigen Einsatz von Cambinol und weder additiver noch suppressiver Effekte auf die Etoposid-Zytotoxizität erschienen weitere Kombinationsversuche nicht sinnvoll.

Diese Ergebnisse passen nicht zu früheren Publikationen. Portmann et al. erbrachten den Nachweis, dass die Inhibition von SIRT1 durch Cambinol einen zytostatischen und proliferationsmindernden Effekt auf hepatozelluläre Karzinomzellen (HCC) in vitro verursacht und der Tumorförmation in vivo entgegenwirkt (Portmann et al. 2013). Auch in Versuchen an Brustkrebszellen (Holloway et al. 2013) offenbarte Cambinol tumorsupprimierende Effekte. Eine andere Studie demonstrierte, dass SIRT1 in adulten T-Zell-Leukämiezellen überexprimiert ist und dessen Inhibition mit Sirtinol, dass dem Cambinol ähnlich ist, Apoptose induzierte (Kozako et al. 2012).

Im Gegensatz zu dieser Dissertation beschreiben Heltweg et al. für Cambinol in Tierexperimenten für das Burkitt-Lymphom einen deutlichen antineoplastischen Effekt (Heltweg et al. 2006). In einer klinischen Studie am aggressiven B-Zell-Lymphom konnte der Einsatz des Sirtuin-Inhibitors Niacinamid das klinische Ergebnis verbessern, wenn dieser mit HDAC-Inhibitoren kombiniert wurde (Amengual et al. 2013). Jedoch kann man aus diesen wenigen Daten derartiger Sirtuin-Inhibitionsversuche keine Therapiekonzepte ableiten und weitere Forschung ist notwendig.

Vergleichbare Studien zu kindlichen Leukämien gibt es bis jetzt noch nicht. Die aufgezeigten Unterschiede zwischen dieser Arbeit und anderen Studien könnten auch darin begründet sein, dass es deutliche Unterschiede in der adulten und pädiatrischen Tumorgenese gibt.

### **5.5. Ausblick auf die weitere Forschung**

Das Bestreben, die komplexen physiologischen Funktionen der Sirtuine zu etablieren, besteht seit vielen Jahren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Rolle der Sirtuine in Krebszellen umstritten bleibt. Erneut konnte gezeigt werden, dass Krebszellen die Sirtuine erhöht exprimieren und eine Überexpression mit einem ungünstigen klinischen Verlauf korreliert.

Zukünftige Strategien zielen darauf, Therapien adaptiert an das Risikoprofil der Patienten zu individualisieren. Auf diese Weise könnte eine spezifische Medikation für die jeweiligen Tumorzellen erfolgen und damit ein besseres

klinisches Ergebnis erzielt werden. In diesem Zusammenhang wäre die Sirtuinisoenzym-Expression sicherlich ein interessanter Marker in diversen Tumorentitäten. Derzeit bleibt es dennoch eine unbeantwortete Frage, ob breite oder Isoform-spezifische Hemmung der Sirtuine einen überlegenen therapeutischen Effekt besäße. Jedoch bietet die spezifische Inhibition der überexprimierten Histondeacetylasen der Klasse III in einer bestimmten Malignität das Potential eines therapeutischen Vorteils und geringerer medikamenteninduzierter Nebenwirkungen (Balasubramanian et al. 2009).

Für die weitere Bearbeitung der Thematik hält die Forschung noch eine Reihe von Möglichkeiten offen, mit welchen die Wirkungsmechanismen der Sirtuine geklärt werden können. Insgesamt wirkt GW5074 im Vergleich zu Cambinol auf die Chemotherapie synergistisch. Wenn sich dies auch in der Kombination mit weiteren Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Doxorubicin oder Cyclophosphamid bestätigen ließe, wäre der Einsatz als kombinierte antileukämische Therapie in der Zukunft vielleicht möglich.

Um die molekularen Gegebenheiten zu verstehen, ist eine Überprüfung der p53-Acetylierung nach den verschiedenen Behandlungen zum Beispiel mittels Western Blot möglich. Des Weiteren könnten andere pro- und anti-apoptotische Proteine (Bcl-2, Bax, Bak) durch Realtime-PCR untersucht werden. Auch weitere posttranskriptionale Modifikation der Proteine neben der Deacetylierung könnten im Zusammenhang mit der Tumorgenese analysiert werden.

Eine Tumorsuppression durch selektive Sirtuin-Inhibition ist nicht gänzlich auszuschließen. Um die eigentliche Wirkung von SIRT5 in Krebszellen und auf Zytostatika zu entschlüsseln, ist die Verwendung weiterer Sirtuin-Inhibitoren, beispielsweise Tenovin-1, Sirtinol oder Niacinamid, denkbar. Zusätzlich überlegenswert ist die Durchführung eines siRNA-Knockdowns von SIRT5. Weiterführend wäre es auch interessant zu klären, welche Erkenntnisse der Einsatz von SIRT5-Aktivatoren in der Tumorgenese liefert.

## 6. Schlussfolgerung

Um die genaue Bedeutung der Sirtuine in Tumoren aufzuzeigen, ist es erforderlich, individuell und tumorspezifisch die Expressionen der sieben Isoenzyme zu analysieren. In diesem Projekt wurde die klinische Relevanz der HDAC der Klasse III in kindlicher akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) evaluiert.

Summa summarum ergibt sich aus dieser Studie, dass die Sirtuine in pädiatrischer ALL eine wichtige Rolle spielen. Diese Dissertation demonstrierte die gesteigerte Expression aller sieben Sirtuinisoenzyme in den Leukämiezellen im Vergleich zu gesunden Knochenmarkzellen. Es zeigte sich, dass besonders die erhöhte Expression von SIRT5, einer mitochondrial lokalisierten Desuccinylase und Deacetylase, mit prognostisch ungünstigen Parametern korreliert. Generell ist sehr wenig über dieses Sirtuin bekannt. Diese Arbeit deutet darauf hin, dass SIRT5 nicht nur wichtiger Regulator des zellulären Metabolismus ist, sondern auch an der akuten lymphoblastischen Leukämie beteiligt sein könnte. Damit ist SIRT5 möglicherweise ein neuer therapeutischer Angriffspunkt und prognostischer Marker für das Überleben der jungen ALL-Patienten.

Welche konkrete Funktion die sieben Sirtuine in kindlichen Leukämiezellen haben, bleibt jedoch offen und bietet Grund, weitere Forschung auf diesem Gebiet zu betreiben. Das Zusammenspiel tumorsuppressiver und -begünstigender Proteine scheint von größerer Komplexität zu sein. Die Genexpressionsanalyse sowie mRNA-Bestimmung reichen für eine profunde Beurteilung nicht aus. Dazu könnten kontextbezogene Proteinanalysen weitere Erkenntnisse über die Sirtuine liefern.

Auf Grundlage dieser Studie ist von einer funktionellen Relevanz und aktiven Rolle der erhöhten Sirtuin-Expression in kindlichen ALL-Zellen auszugehen. Funktionelle Tests mit Blick auf Zellwachstum und Zelltod implizierten einige antineoplastische Wirkungen der spezifischen Sirtuin-Inhibition. Als effektiv erwies sich eine Monotherapie mit GW5074. Dabei wurde evaluiert, dass die Hemmung von SIRT5 einen Caspase-unabhängigen Zelltod-Mechanismus auslöst.

Die Hypothese, dass es einen synergistischen Effekt bei der Kombinationsbehandlung von Sirtuininhibitoren und Chemotherapeutika gibt,

konnte in dieser Promotion differenziert in zwei kindlichen ALL-Zelllinien untersucht werden. Die Inhibition von SIRT5 hatte dabei einen moderat additiven Einfluss auf die Wirkung von Etoposid und einen stärkeren Einfluss auf Vincristin.

Im Gegensatz dazu bewirkte Cambinol, spezifisch SIRT1 und SIRT2 hemmend, keinerlei relevante Effekte für die Leukämietherapie bei Kindern. Weitere Experimente, die einen Schwerpunkt auf potentiell klinisch nutzbare Kombinationsbehandlungen von unterschiedlichen Sirtuin-Inhibitoren mit anderen tumortherapeutischen Verfahren und Chemotherapeutika legen, wären denkbare Forschungsziele.

Mit dieser Dissertation ist eine laborexperimentelle Grundlage für weitergehende Analysen gelegt, in denen die Funktion der sieben Sirtuine und die Wirksamkeit der spezifischen Hemmung in Hinblick auf die Induktion der Apoptose und anderer tumorrelevanter Mechanismen überprüft werden sollte. Desweiteren können diese Ergebnisse auch als erste Möglichkeit für neue spezifischere Behandlungsoption mit geringeren Nebenwirkungen sowie der Verbesserung des eventfreien Überlebens bei der häufigsten Krebserkrankung von Kindern, der akuten lymphoblastischen Leukämie, angesehen werden.

## 7. Anhang

### 7.1. Tabelle 7 - Sirtuin-Expression in Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern

	Variablen	SIRT1			SIRT2			SIRT3		
		Median	Q1-Q3*	P-Wert**	Median	Q1-Q3*	P-Wert**	Median	Q1-Q3*	P-Wert**
Alter	1-9 Jahre (n:58, 66%)	1,40	1,09 – 2,09	0,011	1,56	1,20 – 2,56	0,030	2,84	1,64 – 3,85	0,202
	>9 Jahre (n:30, 34 %)	2,30	1,32 – 2,89		2,26	1,50 – 3,40		2,90	2,14 – 5,74	
Initiale Leukozyten	< 50.000/ $\mu$ l (n:60, 67%)	1,47	1,09 – 2,27	0,167	1,59	1,34 – 2,53	0,040	2,56	1,58 – 3,82	0,041
	> 50.000/ $\mu$ l (n:29, 33%)	1,91	1,22 – 2,68		2,46	1,23 – 3,30		3,06	2,43 – 4,66	
Immunophänotyp	B-Zell (n:67, 76%)	1,58	1,10 – 2,40	0,392	1,78	1,40 – 2,94	0,112	2,86	1,83 – 3,94	0,973
	T-Zell (n:21, 24%)	2,00	1,10 – 2,44		1,40	1,16 – 2,55		2,87	1,70 – 4,05	
Ansprechen auf Prednison	Gut (n:75, 87%)	1,61	1,10 – 2,40	0,153	1,77	1,39 – 2,94	0,831	2,84	1,68 – 3,94	0,194
	Schlecht (n:11, 13%)	2,17	1,10 – 3,95		1,53	1,23 – 3,56		3,06	2,28 – 6,53	
ETV6-RUNX1 t(12,21)	Negativ (n:43, 80%)	1,91	1,27 – 2,52	0,015	2,46	1,38 – 3,27	0,242	3,06	2,44 – 4,46	0,013
	Positiv (n:11, 20%)	1,12	0,73 – 1,74		1,69	1,39 – 2,01		1,68	1,56 – 2,97	
Ploidie	$\leq 50$ Chromosomen (n:44, 73%)	1,81	1,11 – 2,48	0,536	2,26	1,39 – 3,13	0,263	2,91	1,74 – 4,15	0,349
	> 50 Chromosomen (n:16, 27%)	1,93	1,61 – 2,40		1,63	1,41 – 2,41		3,24	2,22 – 5,75	
Klinisches Ergebnis	CR *** (n:71, 80%)	1,48	1,09 – 2,28	0,113	1,69	1,24 – 2,87	0,337	2,84	1,59 – 3,87	0,029
	Rezidiv oder Tod (n:18, 20%)	2,13	1,23 – 2,97		2,00	1,35 – 3,14		3,58	2,38 – 6,12	

Variablen	SIRT4			SIRT5			SIRT6			SIRT7		
	Median	Q1-Q3*	P-Wert**	Median	Q1-Q3*	P-Wert**	Median	Q1-Q3*	P-Wert**	Median	Q1-Q3*	P-Wert**
1-9 Jahre (n:58, 66%)	3,55	1,97 – 5,47	0,041	3,58	2,71 – 4,90	0,010	1,94	1,49 – 2,66	0,001	1,62	1,18 – 2,16	0,028
>9 Jahre (n:30, 34 %)	5,78	2,69 – 9,78		4,56	3,24 – 8,88		3,35	2,18 – 5,29		1,90	1,35 – 3,22	
< 50.000/ $\mu$ l (n:60, 67%)	3,60	1,97 – 6,26	0,132	3,51	2,69 – 4,89	0,018	2,09	1,39 – 2,69	0,018	1,49	1,06 – 2,15	0,006
> 50.000/ $\mu$ l (n:29, 33%)	4,59	2,66 – 7,80		4,47	3,21 – 7,22		2,71	1,87 – 4,09		1,92	1,58 – 3,10	
B-Zell (n:67, 76%)	3,60	2,13 – 6,62	0,141	3,63	2,75 – 5,18	0,195	2,12	1,51 – 2,90	0,031	1,67	1,06 – 2,45	0,330
T-Zell (n:21, 24%)	5,78	2,70 – 10,79		4,08	3,09 – 8,01		2,82	2,04 – 4,82		1,66	1,40 – 2,76	
Gut (n:75, 87%)	3,61	2,30 – 6,88	0,286	3,75	2,75 – 5,72	0,335	2,24	1,51 – 3,34	0,060	1,67	1,23 – 2,39	0,574
Schlecht (n:11, 13%)	5,78	2,56 – 11,31		4,41	3,18 – 7,54		3,24	2,53 – 4,88		1,61	1,36 – 2,45	
Negativ (n:43, 80%)	4,14	1,70 – 6,98	0,895	4,47	3,24 – 7,54	0,007	2,24	1,52 – 3,36	0,251	1,78	1,28 – 3,06	0,105
Positiv (n:11, 20%)	3,61	3,06 – 5,35		2,87	1,72 – 3,53		1,74	1,45 – 2,36		1,29	0,98 – 2,21	
Chromosomen $\leq 50$ (n:44, 73%)	4,40	2,77 – 7,06	0,633	4,14	2,84 – 6,66	0,880	2,52	1,83 – 3,91	0,242	1,83	1,37 – 2,62	0,701
Chromosomen > 50 (n:16, 27%)	3,75	2,06 – 7,02		4,11	3,26 – 5,16		2,02	1,50 – 3,46		1,76	1,24 – 2,33	
CR *** (n:71, 80%)	3,60	2,37 – 6,30	0,432	3,53	2,74 – 4,99	0,005	2,12	1,47 – 2,88	0,030	1,61	1,22 – 2,21	0,037
Rezidiv oder Tod (n:18, 20%)	4,89	2,13 – 7,91		5,31	3,90 – 7,94		2,97	2,15 – 5,14		2,12	1,57 – 3,03	

\*Q1 – unteres Quartil, Q3 – oberes Quartil      \*\* mit Mann-Whitney-Test kalkuliert; fett gedruckt: statistisch signifikant nach Holm-Bonferroni-Korrektur      \*\*\*CR – Komplete Remission



## 7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Phylogenetische Gliederung der HDAC und SIRT
- Abb. 2.: Amplifikationsdiagramm
- Abb. 3: Lichtstreuungsarten einer Zelle
- Abb. 4: Dotplots unbehandelter CCRF-CEM (A) und Jurkat (B) mit abgegrenzter Population (P1)
- Abb. 5: Histogramme der Zelltodanalyse (A) und Messung des mitochondrialen Membranpotentials (B) bei CCRF-CEM
- Abb. 6: Sirtuinisoenzym-Expression in ALL-Patienten und gesunden Spendern
- Abb. 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für SIRT5
- Abb. 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve für SIRT6
- Abb. 9: Caspase 3-Aktivität in CCRF-CEM-Zellen nach Behandlungen mit Etoposid und Vincristin
- Abb. 10: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit der Etoposid- und Vincristin-Konzentrationen
- Abb. 11: Caspase 3-Aktivität in CCRF-CEM-Zellen nach Behandlungen mit Cambinol und GW5074
- Abb. 12: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in CCRF-CEM-Zellen in Abhängigkeit der Cambinol- (A, B) und GW5074-Konzentrationen (C, D)
- Abb. 13: Wirkung von Cambinol und GW5074 auf den Etoposid-induzierten Zelltod (A) und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  (B) in CCRF-CEM-Zellen
- Abb. 14: Wirkung von GW5074 auf den Vincristin-induzierten Zelltod (A) und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  (B) in CCRF-CEM-Zellen
- Abb. 15: Caspase 3-Aktivität in Jurkat-Zellen
- Abb. 16: Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  in Jurkat-Zellen
- Abb. 17: Wirkung von GW5074 auf den Etoposid-induzierten Zelltod und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  sowie die Caspase-Aktivität in Jurkat-Zellen
- Abb. 18: Effekte von z-VAD auf Zelltod (A) und Verlust des  $\Delta\Psi_m$  (B) in CCRF-CEM- und Jurkat-Zellen

### **7.3. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Vergleich der Sirtuine
Tab. 2:	SIRT1 als Tumorsuppressor und Tumorpromotor.
Tab. 3:	Konzentrationen von GW5074, Cambinol und z-VAD für die Vorbehandlungen
Tab. 4:	Eingesetzte Zytostatikakonzentrationen
Tab. 5:	Konzentrationen für z-VAD-Versuche
Tab. 6:	Spearman-Korrelation der Expression von Sirtuinen und p53
Tab. 7:	Sirtuin-Expression in Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern

## 7.4. Literaturverzeichnis

- Advani AS, Gibson S, Douglas E, Diacovo J, Elson P, Kalaycio M, Copelan E, Sekeres M, Sobecks R, Sungren S, Lagoo A, Rizzieri D, Hsi E. 2011. Histone H4 acetylation by immunohistochemistry and prognosis in relapsed acute lymphocytic leukaemia (ALL). *Br J Haematol*, 153 (4):504-507.
- Alhazzazi TY, Kamarajan P, Joo N, Huang JY, Verdin E, D'Silva NJ, Kapila YL. 2011. Sirtuin-3 (SIRT3), a novel potential therapeutic target for oral cancer. *Cancer*, 117 (8):1670-1678.
- Altman DG, Bland JM. 1998. Time to event (survival) data. *BMJ*, 317 (7156):468-469.
- Amengual JE, Clark-Garvey S, Kalac M, Scotto L, Marchi E, Neylon E, Johannet P, Wei Y, Zain J, O'Connor OA. 2013. Sirtuin and pan-class I/II deacetylase (DAC) inhibition is synergistic in preclinical models and clinical studies of lymphoma. *Blood*, 122 (12):2104-2113.
- Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. 2012. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 11 (5):384-400.
- Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, Payne AP, George WD, Shiels PG. 2006. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer*, 95 (8):1056-1061.
- Balasubramanian S, Verner E, Buggy JJ. 2009. Isoform-specific histone deacetylase inhibitors: the next step? *Cancer Lett*, 280 (2):211-221.
- Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li W, Chua KF. 2012. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature*, 487 (7405):114-118.
- Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. 2012. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov*, 11 (6):443-461.
- Bhojwani D, Pei D, Sandlund JT, Jeha S, Ribeiro RC, Rubnitz JE, Raimondi SC, Shurtleff S, Onciu M, Cheng C, Coustan-Smith E, Bowman WP, Howard SC, Metzger ML, Inaba H, Leung W, Evans WE, Campana D, Relling MV, Pui CH. 2012. ETV6-RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*, 26 (2):265-270.
- Bosch-Presegue L, Vaquero A. 2011. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, 2 (6):648-662.
- Bosch-Presegue L, Vaquero A. 2013. Sirtuins in stress response: guardians of the genome. *Oncogene*.
- Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, Craddock C, Turner BM. 2005. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, 19 (10):1751-1759.
- Buchwald M, Kramer OH, Heinzl T. 2009. HDACi--targets beyond chromatin. *Cancer Lett*, 280 (2):160-167.
- Cha EJ, Noh SJ, Kwon KS, Kim CY, Park BH, Park HS, Lee H, Chung MJ, Kang MJ, Lee DG, Moon WS, Jang KY. 2009. Expression of DBC1 and SIRT1 is associated with poor prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*, 15 (13):4453-4459.
- Chen J, Odenike O, Rowley JD. 2010. Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nat Rev Cancer*, 10 (1):23-36.
- Chen J, Zhang B, Wong N, Lo AW, To KF, Chan AW, Ng MH, Ho CY, Cheng SH, Lai PB, Yu J, Ng HK, Ling MT, Huang AL, Cai XF, Ko BC. 2011. Sirtuin 1 is upregulated in a subset of hepatocellular carcinomas where it is essential for

- telomere maintenance and tumor cell growth. *Cancer Res*, 71 (12):4138-4149.
- Chen Y, Hu Y, Michaels S, Segal D, Brown D, Li S. 2009. Inhibitory effects of omacetaxine on leukemic stem cells and BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in mice. *Leukemia*, 23 (8):1446-1454.
- Chu F, Chou PM, Zheng X, Mirkin BL, Rebbaa A. 2005. Control of multidrug resistance gene *mdr1* and cancer resistance to chemotherapy by the longevity gene *sirt1*. *Cancer Res*, 65 (22):10183-10187.
- Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. 2003. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, 193:10-21.
- Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. 2005. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:495-528.
- Du J, Zhou Y, Su X, Yu JJ, Khan S, Jiang H, Kim J, Woo J, Kim JH, Choi BH, He B, Chen W, Zhang S, Cerione RA, Auwerx J, Hao Q, Lin H. 2011. Sirt5 is a NAD-dependent protein lysine demalonylase and desuccinylase. *Science*, 334 (6057):806-809.
- Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358 (11):1148-1159.
- Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, Teruya-Feldstein J, Moreira PI, Cardoso SM, Clish CB, Pandolfi PP, Haigis MC. 2011. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1alpha destabilization. *Cancer Cell*, 19 (3):416-428.
- Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA. 2008. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One*, 3 (4):e2020.
- Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. 2006. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes Dev*, 20 (9):1075-1080.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. 2005. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37 (4):391-400.
- Friedman DL, Whitton J, Leisenring W, Mertens AC, Hammond S, Stovall M, Donaldson SS, Meadows AT, Robison LL, Neglia JP. 2010. Subsequent neoplasms in 5-year survivors of childhood cancer: the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst*, 102 (14):1083-1095.
- Gertz M, Steegborn C. 2010. Function and regulation of the mitochondrial sirtuin isoform Sirt5 in Mammalia. *Biochim Biophys Acta*, 1804 (8):1658-1665.
- Gidding CE, Kellie SJ, Kamps WA, de Graaf SS. 1999. Vincristine revisited. *Crit Rev Oncol Hematol*, 29 (3):267-287.
- Glozak MA, Seto E. 2007. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, 26 (37):5420-5432.
- Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J. 2013. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 37 (10):1200-1207.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144 (5):646-674.
- Hande KR. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer*, 34 (10):1514-1521.
- Heltweg B, Gattabontoni T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, Kollipara R, Depinho RA, Gu Y, Simon JA, Bedalov A. 2006. Antitumor activity of a small-

- molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. *Cancer Res*, 66 (8):4368-4377.
- Herranz D, Munoz-Martin M, Canamero M, Mulero F, Martinez-Pastor B, Fernandez-Capetillo O, Serrano M. 2010. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun*, 1:3.
- Hiratsuka M, Inoue T, Toda T, Kimura N, Shirayoshi Y, Kamitani H, Watanabe T, Ohama E, Tahimic CG, Kurimasa A, Oshimura M. 2003. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 309 (3):558-566.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16):7276-7280.
- Holloway KR, Barbieri A, Malyarchuk S, Saxena M, Nedeljkovic-Kurepa A, Cameron Mehl M, Wang A, Gu X, Pruitt K. 2013. SIRT1 positively regulates breast cancer associated human aromatase (CYP19A1) expression. *Mol Endocrinol*, 27 (3):480-490.
- Huffman DM, Grizzle WE, Bamman MM, Kim JS, Eltoum IA, Elgavish A, Nagy TR. 2007. SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res*, 67 (14):6612-6618.
- Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. 2000. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, 47 (3):549-555.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403 (6771):795-800.
- Jaroszeski MJ, Radcliff G. 1999. Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol*, 11 (1):37-53.
- Jiang H, Khan S, Wang Y, Charron G, He B, Sebastian C, Du J, Kim R, Ge E, Mostoslavsky R, Hang HC, Hao Q, Lin H. 2013. SIRT6 regulates TNF-alpha secretion through hydrolysis of long-chain fatty acyl lysine. *Nature*, 496 (7443):110-113.
- Jones PA, Baylin SB. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*, 128 (4):683-692.
- Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J. 2009. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem*, 284 (27):18210-18217.
- Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, van der Meer R, Nguyen P, Savage J, Owens KM, Vassilopoulos A, Ozden O, Park SH, Singh KK, Abdulkadir SA, Spitz DR, Deng CX, Gius D. 2010. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, 17 (1):41-52.
- Kozako T, Aikawa A, Shoji T, Fujimoto T, Yoshimitsu M, Shirasawa S, Tanaka H, Honda S, Shimeno H, Arima N, Soeda S. 2012. High expression of the longevity gene product SIRT1 and apoptosis induction by sirtinol in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer*, 131 (9):2044-2055.
- Lane AA, Chabner BA. 2009. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*, 27 (32):5459-5468.
- Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wolfel C, Huber C, Wolfel T. 2005. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (44):16013-16018.
- Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. 2010. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. *PLoS One*, 5 (5):e10486.

- Liu B, Che W, Zheng C, Liu W, Wen J, Fu H, Tang K, Zhang J, Xu Y. 2013a. SIRT5: a safeguard against oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 32 (4):1050-1059.
- Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. 2013b. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett*.
- Loeffler M, Kroemer G. 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256 (1):19-26.
- Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, Kim J, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Yang Y, Chen Y, Hirschey MD, Bronson RT, Haigis M, Guarente LP, Farese RV, Jr., Weissman S, Verdin E, Schwer B. 2007. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, 27 (24):8807-8814.
- Lugrin J, Ciarlo E, Santos A, Grandmaison G, dos Santos I, Le Roy D, Roger T. 2013. The sirtuin inhibitor cambinol impairs MAPK signaling, inhibits inflammatory and innate immune responses and protects from septic shock. *Biochim Biophys Acta*, 1833 (6):1498-1510.
- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107 (2):137-148.
- Ma JX, Li H, Chen XM, Yang XH, Wang Q, Wu ML, Kong QY, Li ZX, Liu J. 2013. Expression patterns and potential roles of SIRT1 in human medulloblastoma cells in vivo and in vitro. *Neuropathology*, 33 (1):7-16.
- Ma X, Ezzeldin HH, Diasio RB. 2009. Histone deacetylase inhibitors: current status and overview of recent clinical trials. *Drugs*, 69 (14):1911-1934.
- Mahlknecht U, Ho AD, Letzel S, Voelter-Mahlknecht S. 2006. Assignment of the NAD-dependent deacetylase sirtuin 5 gene (SIRT5) to human chromosome band 6p23 by in situ hybridization. *Cytogenet Genome Res*, 112 (3-4):208-212.
- Marks PA, Breslow R. 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol*, 25 (1):84-90.
- Martincic D, Hande KR. 2005. Topoisomerase II inhibitors. *Cancer Chemother Biol Response Modif*, 22:101-121.
- Medda F, Russell RJ, Higgins M, McCarthy AR, Campbell J, Slawin AM, Lane DP, Lain S, Westwood NJ. 2009. Novel cambinol analogs as sirtuin inhibitors: synthesis, biological evaluation, and rationalization of activity. *J Med Chem*, 52 (9):2673-2682.
- Milde T, Oehme I, Korshunov A, Kopp-Schneider A, Remke M, Northcott P, Deubzer HE, Lodrini M, Taylor MD, von Deimling A, Pfister S, Witt O. 2010. HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth. *Clin Cancer Res*, 16 (12):3240-3252.
- Moreno DA, Scrideli CA, Cortez MA, de Paula Queiroz R, Valera ET, da Silva Silveira V, Yunes JA, Brandalise SR, Tone LG. 2010. Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 150 (6):665-673.
- Moricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dordelmann M, Loning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M. 2008. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*, 111 (9):4477-4489.
- Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. 2009. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, 137 (3):560-570.

- Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. 2004. Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science*, 306 (5704):2105-2108.
- Nitiss JL. 2009. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nat Rev Cancer*, 9 (5):327-337.
- Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, Kopp-Schneider A, Westermann F, Ulrich SM, von Deimling A, Fischer M, Witt O. 2009. Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 15 (1):91-99.
- Ogura M, Nakamura Y, Tanaka D, Zhuang X, Fujita Y, Obara A, Hamasaki A, Hosokawa M, Inagaki N. 2010. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun*, 393 (1):73-78.
- Olmos Y, Brosens JJ, Lam EW. 2011. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resist Updat*, 14 (1):35-44.
- Park J, Chen Y, Tishkoff DX, Peng C, Tan M, Dai L, Xie Z, Zhang Y, Zwaans BM, Skinner ME, Lombard DB, Zhao Y. 2013. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. *Mol Cell*, 50 (6):919-930.
- Peck B, Chen CY, Ho KK, Di Fruscia P, Myatt SS, Coombes RC, Fuchter MJ, Hsiao CD, Lam EW. 2010. SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther*, 9 (4):844-855.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6):509-515.
- Pfister JA, Ma C, Morrison BE, D'Mello SR. 2008. Opposing effects of sirtuins on neuronal survival: SIRT1-mediated neuroprotection is independent of its deacetylase activity. *PLoS One*, 3 (12):e4090.
- Porter AG, Janicke RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6 (2):99-104.
- Portmann S, Fahrner R, Lechleiter A, Keogh A, Overney S, Laemmle A, Mikami K, Montani M, Tschan MP, Candinas D, Stroka D. 2013. Antitumor effect of SIRT1 inhibition in human HCC tumor models in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 12 (4):499-508.
- Potente M, Dimmeler S. 2008. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. *Cell Cycle*, 7 (14):2117-2122.
- Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejana E, Alt FW, Zeiher AM, Dimmeler S. 2007. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth. *Genes Dev*, 21 (20):2644-2658.
- Pui CH, Campana D, Evans WE. 2001. Childhood acute lymphoblastic leukaemia - current status and future perspectives. *Lancet Oncology*, 2 (10):597-607.
- Pui CH, Robison LL, Look AT. 2008. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371 (9617):1030-1043.
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. 2011. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol*, 29 (5):551-565.
- Rardin MJ, He W, Nishida Y, Newman JC, Carrico C, Danielson SR, Guo A, Gut P, Sahu AK, Li B, Uppala R, Fitch M, Riiff T, Zhu L, Zhou J, Mulhern D, Stevens RD, Ilkayeva OR, Newgard CB, Jacobson MP, Hellerstein M, Goetzman ES, Gibson BW, Verdin E. 2013. SIRT5 Regulates the Mitochondrial Lysine Succinylome and Metabolic Networks. *Cell Metab*, 18 (6):920-933.
- Riccardi C, Nicoletti I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc*, 1 (3):1458-1461.

- Richards S, Pui CH, Gayon P. 2013. Systematic review and meta-analysis of randomized trials of central nervous system directed therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 60 (2):185-195.
- Rogina B, Helfand SL. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (45):15998-16003.
- Roth M, Chen WY. 2013. Sorting out functions of sirtuins in cancer. *Oncogene*.
- Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, Pounds S, Razzouk BI, Lacayo NJ, Cao X, Meshinchi S, Degar B, Airewele G, Raimondi SC, Onciu M, Coustan-Smith E, Downing JR, Leung W, Pui CH, Campana D. 2010. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *Lancet Oncol*, 11 (6):543-552.
- Sebastian C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R. 2012. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*, 151 (6):1185-1199.
- Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. 2005. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7 (1):77-85.
- Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdastani SK. 2009. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *Am J Pathol*, 174 (5):1619-1628.
- Shang L, Zhou H, Xia Y, Wang H, Gao G, Chen B, Liu Q, Shao C, Gong Y. 2009. Serum withdrawal up-regulates human SIRT1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Cell Mol Med*, 13 (10):4176-4184.
- Sieber OM, Heinimann K, Tomlinson IP. 2003. Genomic instability--the engine of tumorigenesis? *Nat Rev Cancer*, 3 (9):701-708.
- Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. 2014. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer Drugs*, 25 (2):140-149.
- Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW. 2005. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS*, 113 (4):264-268.
- Sonnemann J, Gruhn B, Wittig S, Becker S, Beck JF. 2012. Increased activity of histone deacetylases in childhood acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia: support for histone deacetylase inhibitors as antileukaemic agents. *Br J Haematol*, 158 (5):664-666.
- Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Kramer OH, Beck JF. 2013. p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer*.
- Spiegel S, Milstien S, Grant S. 2012. Endogenous modulators and pharmacological inhibitors of histone deacetylases in cancer therapy. *Oncogene*, 31 (5):537-551.
- Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. 2008. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer*, 122 (8):1859-1867.
- Stimson L, Wood V, Khan O, Fotheringham S, La Thangue NB. 2009. HDAC inhibitor-based therapies and haematological malignancy. *Ann Oncol*, 20 (8):1293-1302.
- Stunkel W, Peh BK, Tan YC, Nayagam VM, Wang X, Salto-Tellez M, Ni B, Entzeroth M, Wood J. 2007. Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J*, 2 (11):1360-1368.



- Suenkel B, Fischer F, Steegborn C. 2013. Inhibition of the human deacetylase Sirtuin 5 by the indole GW5074. *Bioorg Med Chem Lett*, 23 (1):143-146.
- Sundaresan NR, Samant SA, Pillai VB, Rajamohan SB, Gupta MP. 2008. SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol*, 28 (20):6384-6401.
- Taby R, Issa JP. 2010. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*, 60 (6):376-392.
- Toh Y, Ohga T, Endo K, Adachi E, Kusumoto H, Haraguchi M, Okamura T, Nicolson GL. 2004. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 110 (3):362-367.
- Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E. 2008. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, 102 (6):703-710.
- Van Meter M, Mao Z, Gorbunova V, Seluanov A. 2011. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle*, 10 (18):3153-3158.
- Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R, Reinberg D. 2006. SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev*, 20 (10):1256-1261.
- Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107 (2):149-159.
- Wang C, Chen L, Hou X, Li Z, Kabra N, Ma Y, Nemoto S, Finkel T, Gu W, Cress WD, Chen J. 2006. Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol*, 8 (9):1025-1031.
- Wang RH, Sengupta K, Li C, Kim HS, Cao L, Xiao C, Kim S, Xu X, Zheng Y, Chilton B, Jia R, Zheng ZM, Appella E, Wang XW, Ried T, Deng CX. 2008. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, 14 (4):312-323.
- Wang Z, Yuan H, Roth M, Stark JM, Bhatia R, Chen WY. 2013. SIRT1 deacetylase promotes acquisition of genetic mutations for drug resistance in CML cells. *Oncogene*, 32 (5):589-598.
- Weichert W. 2009. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*, 280 (2):168-176.
- Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Rocken C. 2008a. Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*, 9 (2):139-148.
- Weichert W, Roske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C. 2008b. Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 14 (6):1669-1677.
- Wiemels J. 2012. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol Interact*, 196 (3):59-67.
- Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. 2009. HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, 277 (1):8-21.
- Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, Sinclair D. 2004. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature*, 430 (7000):686-689.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26 (37):5541-5552.

- Yeh JM, Nekhlyudov L, Goldie SJ, Mertens AC, Diller L. 2010. A model-based estimate of cumulative excess mortality in survivors of childhood cancer. *Ann Intern Med*, 152 (7):409-417, W131-408.
- Yeung F, Hoberg JE, Ramsey CS, Keller MD, Jones DR, Frye RA, Mayo MW. 2004. Modulation of NF-kappaB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO J*, 23 (12):2369-2380.
- Yoo CB, Jones PA. 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 5 (1):37-50.
- Yuan H, Wang Z, Li L, Zhang H, Modi H, Horne D, Bhatia R, Chen W. 2012. Activation of stress response gene SIRT1 by BCR-ABL promotes leukemogenesis. *Blood*, 119 (8):1904-1914.

## **7.5. Danksagung**

Mein größter Dank gebührt Gott, durch den und für den ich lebe.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. James F. Beck für die freundliche Vergabe dieses interessanten Themas sowie die vielen detaillierten Ratschläge in den regelmäßigen Besprechungen bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Jürgen Sonnemann für die umfassende Betreuung meiner gesamten Arbeit. Danke für viele konstruktive Gespräche, die Versorgung mit theoretischem Wissen sowie jede Ermutigungen und letztendlich für das rasche Korrekturlesen. Des Weiteren bot er mir die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf dem 5<sup>th</sup> Postgraduate Symposium on Cancer Research in Dornburg vorzustellen. Es ist mir eine Ehre in seinem Labor und unter seiner Anleitung promoviert zu haben.

Ein großes Dankschön möchte ich Sabine Becker und Susan Wittig aussprechen, die mich mit ihren praktischen Erfahrungen sowie hilfreichen Empfehlungen während meiner Experimente unterstützten. Ihre organisierte Arbeitsweise habe ich sehr schätzen gelernt.

Vielen Dank an Dr. Mario Walther für die verständigen und förderlichen Hinweise zur Durchführung der statistischen Auswertungen.

Dem IZKF danke ich für das sechsmonatige Promotionsstipendium.

Von Herzen möchte ich meiner Familie, der Christusgemeinde Jena und all meinen Freunden danken, die mich auf vielfältige Weise ermutigten. Ihr seid eine Bereicherung in meinem Leben. Besonders dankbar bin ich meinen Eltern, die mich stets motivierten, mein Bestes zu geben, und mich gelehrt haben, konsequent und zielstrebig zu sein und zu glauben. Danke für alles!

## **7.6. Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. J.F. Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Dr. Mario Walther, Sabine Becker und Susan Wittig,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Rebekka M. Jaeckle, geb. Herrmann